

修 士 学 位 論 文

題 名

移植前機能評価のための肝臓機械灌流法に
おける代謝因子動態に関する研究

指導教授

小原 弘道

准教授

平成31年 1月 10日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科 機械工学専攻

学修番号 17883339

氏名 吉川 遼

学位論文要旨（修士（工学））

論文著者名 吉川 遼

論文題名：

移植前機能評価のための肝臓機械灌流法における代謝因子動態に関する研究

本文

肝臓は代謝や解毒、老廃物の排泄など多岐にわたる機能を有し、生命維持には必要不可欠な臓器である。一方で肝臓は門脈・肝動脈の二重血行支配であり、高効率な物質交換を可能にする類洞構造を始めとした血管構造、特異な性質を有した胆汁を巧みに流す胆管構造など、複雑な流動構造を有した臓器としても知られている。そのため、その多機能性と相まって人工物への代替は困難であることから、末期の肝疾患患者への有効な治療法は肝移植のみなのが現状である。

一方で肝移植は、深刻なドナー不足の現状から、日本国内においては健康な人から肝臓の一部を移植する生体肝移植が主流となっている。しかしながら、ドナーへの大きな負担を考慮すると、今後は生体肝移植に依存しない移植、つまり死体肝移植の推進への取り組みが重要である。

以上のような背景を受けて、注目を集める手法が臓器機械灌流法である。臓器機械灌流法は、血管を介して酸素や栄養を添加した保存液の持続的な供給を行うことで、臓器再生を可能にする体外臓器保存法である。これにより、マージナルドナーと呼ばれるこれまで移植に不適合とされてきた臓器の活用に向けて、世界中で盛んに研究が行われており、欧米を中心とした臨床応用でもその有用性が報告されている。さらに近年では、臓器再生のみにとどまらず、灌流中の流動動態や液中の成分分析による移植前機能評価の可能性に大きな期待を受けている。しかしながら、肝臓が有する複雑な構造や、多様な因子が絡む肝臓機能から、温度や酸素供給を始めとした保存条件は確立されず、移植の可否を決定するための定量的な評価指標が存在しないことなど、克服すべき課題は多い。

そこで本研究では、臓器機械灌流法による心停止後肝臓や分割肝などの障害を有した臓器の機能再生・障害軽減、および新たな移植前機能評価指標の確立を目的に、特に灌流中に得られる肝臓代謝因子に注目して、検討を行った。

本実験では体重 20kg 程度のブタを用い、温阻血時間 (WIT; Warm Ischemia Time) を条件に合わせて管理して肝臓を摘出した。なお、温阻血時間は心停止による血流

停止から臓器摘出までの所要時間であり、臓器機能の状態を規定する指標である。摘出した肝臓は速やかに脱血後、灌流保存を行い、保存後には移植を模擬した体外血液再灌流モデルによりその臓器機能を検証した。本実験では従来用いられている灌流中の流量や血管圧力などの流動指標や、逸脱酵素などの肝機能指標に加え、酸素消費量や液中 pH などの代謝因子に注目して評価を行った。今回注目した代謝因子は、肝臓の重要な働きであるエネルギー代謝、特に ATP 合成能についてその健全性を維持するための重要な要素であることから、その代謝動態に注目した最適な保存条件の検証に加え、灌流中の臓器機能評価指標としての可能性を検討した。本研究では、①室温機械灌流法による心停止後肝臓の機能再生、②室温機械灌流法における人工酸素運搬体含有灌流液の適用、③分割肝移植における低温機械灌流法適用の、3 種類の実験に対して代謝因子動態に注目した評価を行い、指標の有用性、およびそれぞれ機械灌流法による臓器再生・障害軽減の有用性を示した。

本論文は以下に記す全五章から構成される

第一章は緒論であり、肝臓の機能と構造から、肝移植の現状と課題、ドナー不足解消への鍵となる移植不適合臓器や分割肝移植の詳細、体外臓器保存法の種類と、臓器機械灌流法の研究報告、本研究の目的について述べる。

第二章は理論であり、本研究の評価指標として用いた流動指標や逸脱酵素、血液ガス分析の詳細、および代謝因子における理論式と解釈について詳細を述べる。

第三章は実験方法であり、実験に用いた灌流装置の詳細、および実験の具体的な手順、保存後の臓器機能の検証に用いた体外血液再灌流モデルの詳細と検定の結果について述べる。

第四章は結果・考察である。室温機械灌流法の心停止後肝臓への有用性の検討では、①温阻血時間 60 分で摘出したブタ肝臓を 4 時間の室温機械灌流群 (SNMP(WIT60))、対照群として②温阻血時間を揃えた 4 時間の単純冷却保存群 (CS(WIT60))、③臨床的な基準となる温阻血時間なしで 4 時間の単純冷却群 (CS(WIT0))の 3 群について、体外血液再灌流モデルにより保存後の臓器機能を検証した。その結果、SNMP(WIT60)では CS(WIT60)と比し、再灌流中の血管抵抗や逸脱酵素流出量などで有意に良好な結果を示した。加えて、CS(WIT0)と比しても統計学的な差は示されなかったことから、その有用性を明らかにした。さらに、保存中の代謝因子による評価を行うために、温阻血時間 0, 30, 60 分の 3 条件で摘出した肝臓を、4 時間の室温機械灌流、その後体外血液再灌流モデルによる検証を実施し、保存中の代謝因子と再灌流中の各種指標の比較により、灌流中の移植前機能評価指標を検証した。人工酸素運搬体含有灌流液による保存、分割肝移植における機械灌流法適用においても、従来の検証に加えて代謝因子動態による評価を行った。

第五章は、本研究で得られた成果を総括し、今後の展開と課題、その解決法について述べる。

1. 緒論

1.1 肝臓の機能と構造	2
1.1.1 肝臓の働きと肝臓内流動構造	
1.1.2 肝臓代謝機能	
1.2 肝移植の現状	8
1.3 移植不適合臓器	11
1.3.1 温阻血障害	
1.3.2 虚血再灌流障害	
1.4 分割肝移植	13
1.5 体外臓器保存法	15
1.5.1 低温機械灌流法 (HMP; Hypothermic Machine Perfusion)	
1.5.2 室温機械灌流法 (SNMP; Subnormothermic Machine Perfusion)	
1.5.3 恒温機械灌流法 (NMP; Normothermic Machine Perfusion)	
1.6 臓器機械灌流法における移植前臓器機能評価	21
1.7 目的	23

2. 理論

2.1 灌流中の各種評価指標	27
2.1.1 血管圧力・抵抗	
2.1.2 灌流液の成分分析	
2.1.3 代謝因子	
2.2 ICG 蛍光観察	32
2.3 胆管圧測定	33

3. 実験方法

3.1 実験装置	35
3.2 心停止後肝臓への室温機械灌流法の有用性の評価	39
3.2.1 実験方法・手順	
3.2.2 ICG 蛍光観察	
3.3 人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法	42
3.4 分割肝移植への低温機械灌流法の適用	44
3.5 体外血液再灌流モデルによる保存後の臓器機能の検証	47
3.5.1 実験方法・手順	
3.5.2 検定結果	

4. 実験結果

4.1 心停止後肝臓への室温機械灌流法の有用性の評価	63
4.1.1 室温灌流中の流動指標	
4.1.2 室温灌流中の肝機能指標	
4.1.3 室温灌流中の肝臓代謝因子	
4.1.4 体外血液再灌流モデルによる流動指標	
4.1.5 体外血液再灌流モデルによる肝機能指標	
4.1.6 体外血液再灌流モデルによる肝臓代謝因子	
4.1.7 室温灌流中代謝因子と体外血液再灌流モデル各種指標比較	
4.1.8 ICG 蛍光法による肝臓代謝評価	
4.1.9 胆管圧測定による胆管流動と代謝機能評価	

4.2	人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法	115
4.2.1	室温灌流中の流動指標	
4.2.2	室温灌流中の肝機能指標	
4.2.3	室温灌流中の肝臓代謝因子	
4.2.4	体外血液再灌流モデルによる流動指標	
4.2.5	体外血液再灌流モデルによる肝機能指標	
4.2.6	体外血液再灌流モデルによる肝臓代謝因子	
4.3	分割肝移植への低温機械灌流法の適用	144
4.3.1	低温灌流中の流動指標	
4.3.2	低温灌流中の肝機能指標	
4.3.3	低温灌流中の肝臓代謝因子	
4.3.4	体外血液再灌流モデルによる流動指標	
4.3.5	体外血液再灌流モデルによる肝機能指標	
4.3.6	体外血液再灌流モデルによる肝臓代謝因子	
4.4	総合考察	171
5.	結論	173
	謝辞	174
	参考文献	176

一章 緒論

1.1 肝臓の機能と構造

1.1.1 肝臓の働きと肝臓内流動構造

肝臓は非常に多岐にわたる機能を有した臓器として知られており、腸管で吸収された栄養素をグリコーゲンとして貯蔵をおこなうことや、アルブミンやリオ蛋白質に合成しなおして血中に放出するといった代謝機能を営むと同時に、アンモニア、エンドトキシン、薬物などの解毒・排泄をおこなうことで、人体が生命維持をおこなうにおいて重要な役割を担っている⁽¹⁾ (Table 1.1.1)。そのため肝臓が機能不全に陥ると、重大な生命の危機につながるが、重度な肝不全患者への有効な治療法は肝移植のみである。しかしながら肝移植は慢性的なドナー不足や、移植時の拒絶反応など多くの問題を抱えているのが現状である。

同時に肝臓は非常に巧みで複雑な流れの構造を有した臓器である。流入する血管には、心臓から酸素を多く含んだ血液を運んでくる肝動脈(HA: Hepatic Artery)と、腸などの消化器官から吸収された栄養を多く含んだ血液を多く含んだ門脈(PV: Portal Vein)という二種類の血管が存在する。肝臓に流入する血液はおよそ 7 割が門脈、残りの 3 割が肝動脈を流れるものである。これらの血管は肝臓の中で幾重にも分岐を繰り返し最終的に肝小葉(Hepatic Lobule)という組織で合流し、肝小葉中では物質交換を巧みにおこなうための特異な構造を有した類洞(Sinusoid)と呼ばれる細い血管を通り、中心静脈(CV: Central Vein)、肝静脈(HV: Hepatic Vein)を経て心臓へ戻る。物質交換をおこなった肝細胞(Hepatocytes)は、体内の代謝物や、消化酵素などの成分により、特異な物性を有する胆汁(Bile)を生成しており、その胆汁は毛細胆管を通り一度胆嚢(Gall Bladder)に貯蔵、濃縮された後、肝外にある胆管(Bile Duct)を通り十二指腸に流出し、消化の促進をおこなう重要な役割を担っている⁽²⁾。一方で、これらの構造の流動特性は、臓器機能と密接に関連していると考えられているが、その特性は必ずしも明らかではな

いことから、肝臓の多機能性と合わせて人工物による代替を困難にする要因となっている、また本研究ではこのような血管構造と胆管構造のことを総称して、肝臓内流動構造と定義する。(Fig.1.1.1)

また本研究では人間のものと拡散と流動の関係が近く、臨床への架け橋として重要なブタ臓器を用いておこなった。ブタの肝臓は 5 つの葉に分類されそれぞれ LL (Left lateral lobe), LM (Left median lobe), GB (Gallbladder lobe), RP (Right posterior lobe), CL (Caudate lobe) と呼ばれる(Fig.1.1.2).

1.1.2 肝臓代謝機能

前述のとおり、肝臓は様々な機能を有しており、現時点ではこれらの機能を人工物で代替することは困難である。

中でも肝臓の最も基本的な機能は物質代謝への関わりであり、糖質、脂質、蛋白質の三大栄養素の代謝、特にそれらの中間過程である中間代謝に重要な役割を担っている(Fig.1.1.3)。つまり、肝臓は壮大な化学工場であり、ここで生成した様々な物質を貯蔵し、必要に応じて血液循環を介して各臓器へ輸送する中継基地でもある。中でもグリコーゲンの合成と貯蔵、リポ蛋白質の合成、血漿蛋白質の合成、血液凝固因子の生成は重要な役割である。

また肝臓は代謝の過程を通じて胆汁を合成する。合成された胆汁は、前述した小腸での脂肪の消化や吸収を助けるだけではなく、カルシウムや不要となったビリルビンの排泄経路としての役割も担う。同時に、薬物や毒物も肝臓で代謝、すなわち解毒され、胆汁として排泄されたり、水溶性となって腎臓から排泄される⁽¹⁾。

Table 1.1.1 Liver functions⁽¹⁾

中間代謝	糖代謝	グルコースの供給，グリコーゲンの合成・貯蔵，糖新生
	脂質代謝	リポ蛋白質の合成，脂肪酸とコレステロールの合成・分解
	蛋白質代謝	アミノ酸の供給，血漿蛋白質の合成，アンモニアの無害化
胆汁の合成・分泌		ビリルビン（ヘモグロビンの分解産物）を抱合型に変え，排泄しやすくする 胆汁酸を合成し，コレステロール，ビリルビンとともに胆汁として分泌する 胆汁酸は小腸での脂質の消化・吸収を助ける
薬物代謝・解毒		酵素群 P450 の働きで薬物や毒物を代謝し，排泄しやすくする 脱水酵素によりアルコールを分解する
ビタミン・鉄の貯蔵	ビタミン A	脂質とともに吸収され肝臓に貯蔵される レチノール結合蛋白（RBP）と結合して血中に放出される
	ビタミン D	皮膚で紫外線を浴びたコレカルシフェロールは，肝臓で水酸化され活性が強まる さらに腎臓で水酸化され，活性型ビタミン D ₃ となる
	ビ タ ミ ン B ₁₂	回腸で吸収されたコバラミンは肝臓に貯蔵され，胆汁として再び腸管に入る トランスコバラミンと結合して血中を運搬される
	鉄	フェリチンの形で肝臓と脾臓に貯蔵される トランスフェリンと結合して血中に放出される
循環血液量の調節		肝臓は心拍出量の 25% 以上をプールしている
血液の浄化		類洞のクッパー細胞が種々の抗原や老化赤血球を貪欲する

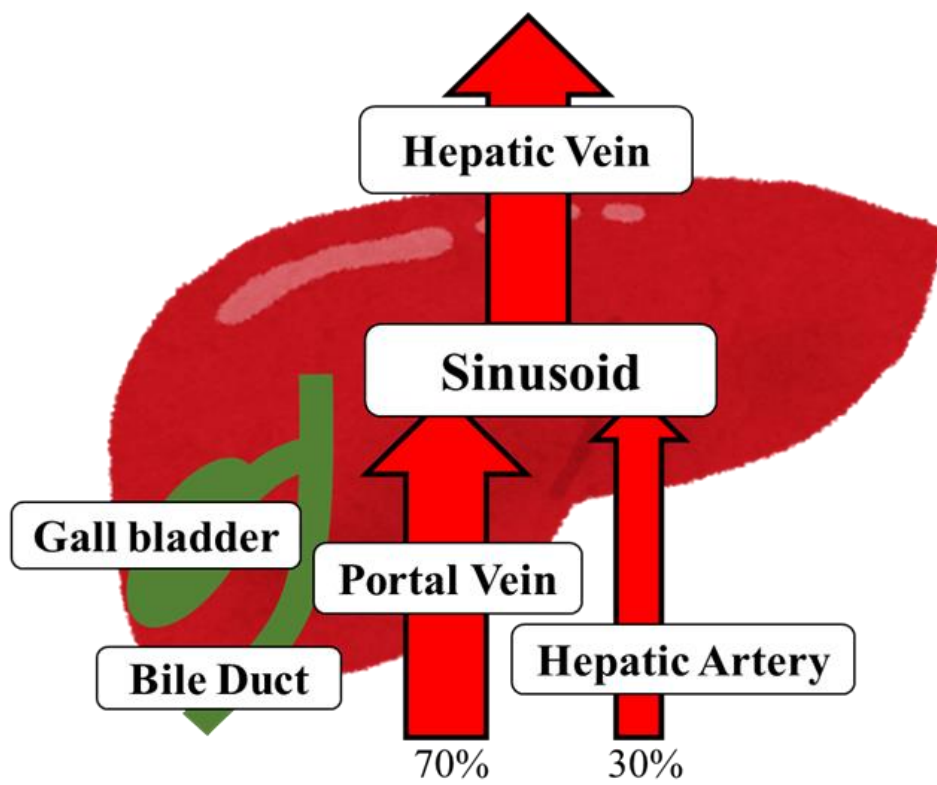


Fig. 1.1.1 The Flow Structures of Liver

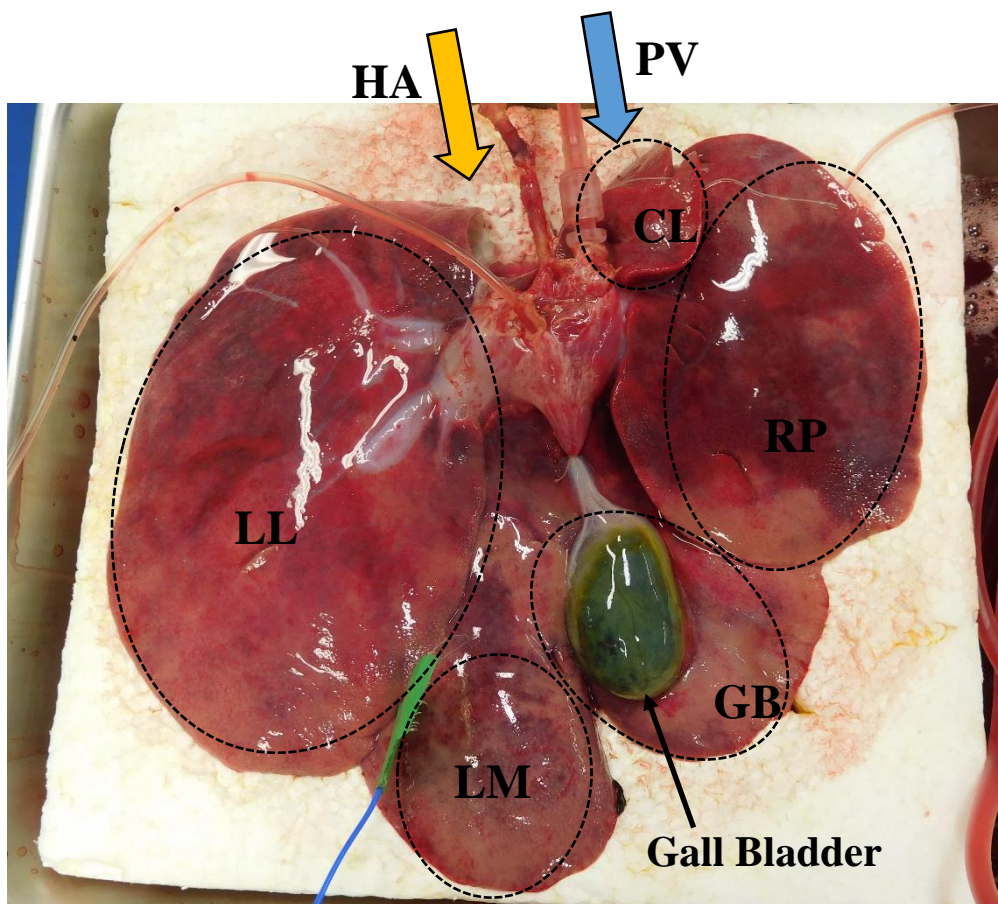


Fig. 1.1.2 The Liver Lobes

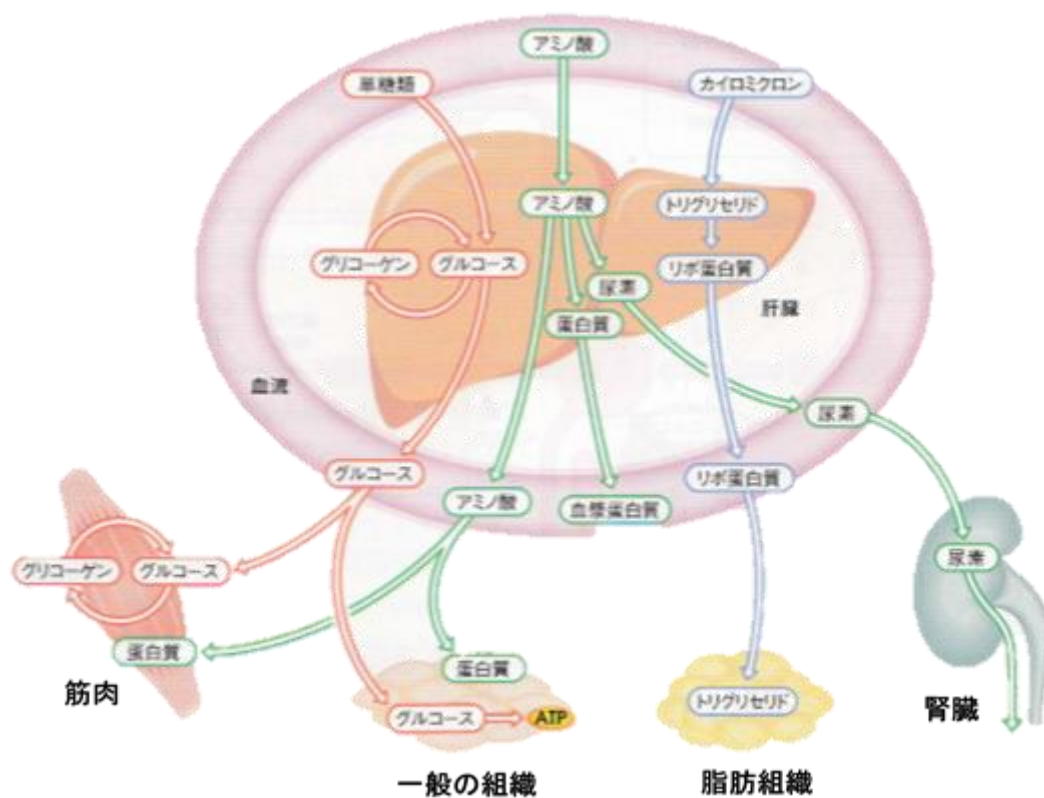


Fig. 1.1.3 Metabolism of the three major nutrients in the liver⁽¹⁾

1.2 肝移植の現状

前述のとおり肝臓の機能は非常に多岐にわたるため、機能不全に陥ると重大な生命の危機に直結する。しかし重度な肝不全患者への有効な治療法は現状、肝移植のみであるが、これも多くの問題を抱えている。

現在国内において臨床で行われている肝臓の臓器移植では脳死肝移植と、生体肝移植に大別される。脳死肝移植は、脳死判定されたドナーから肝臓を移植するものだが、これは慢性的なドナー不足という大きな問題を抱えている。2017年の脳死肝移植はアメリカでは年間 7715 件、日本では 69 件と行われているのに対し、肝臓移植を必要とする待機患者が 2018 年 11 月現在、アメリカでは 13838 人、日本では 331 人と移植数と比し圧倒的に上回っており、これは日本のみならず世界的にも重大な問題となっている⁽³⁾⁽⁴⁾(Fig.1.2.1)。一方、生体肝移植は健康なドナーから肝臓の一部を移植するものであるが、これは通常の肝機能を持つ人ならば、肝臓の高い予備能力によって全体の 7 割程度を切除しても肝不全にならずに、その後一年以内には元の大きさに戻ることによって可能となる手法である。前述のドナー不足の問題から、現在の日本ではこの生体肝移植が、肝移植において広く行われている手法である。しかしながら生体肝移植は、健常者であるドナーへの負担が大きいことや、倫理的な問題など重大な課題を有している。特に日本はこの生体肝移植への依存度が高く、生体肝移植が占める割合はアメリカでは約 5% (2016 年) となっているのに対し、日本は約 87% (2016 年) となっている⁽⁴⁾⁽⁵⁾(Fig.1.2.2)。これは高い医療技術を有しているにもかかわらず、他国と比し日本では極端なドナー不足であることによることから、今後はより死体肝移植の推進への取り組みが重要課題であるといえる⁽⁶⁾ (Fig.1.2.3)。

また国内では肝臓の移植件数の少なさから移植待機登録をあきらめてしまう場合も少なくなく、潜在的には移植待機者数は 3000 人にも上ると言われている。

日本では 2010 年 7 月に脳死を人の死とする改正臓器移植法が施行され、年間の肝臓の臓器提供数も 2009 年の 7 件から 2011 年の 41 件と大幅に増加し、その後も増加傾向を示しているが、依然としてドナー不足が深刻であるのが現状である。

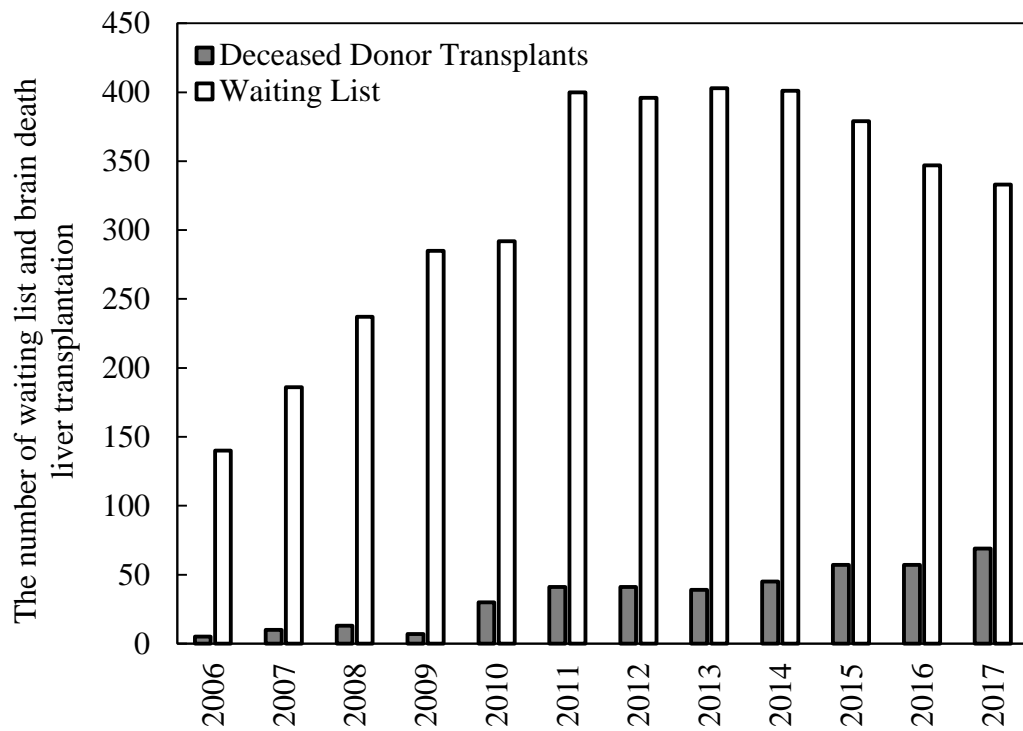


Fig. 1.2.1 The number of waiting list and brain death liver transplantation in Japan

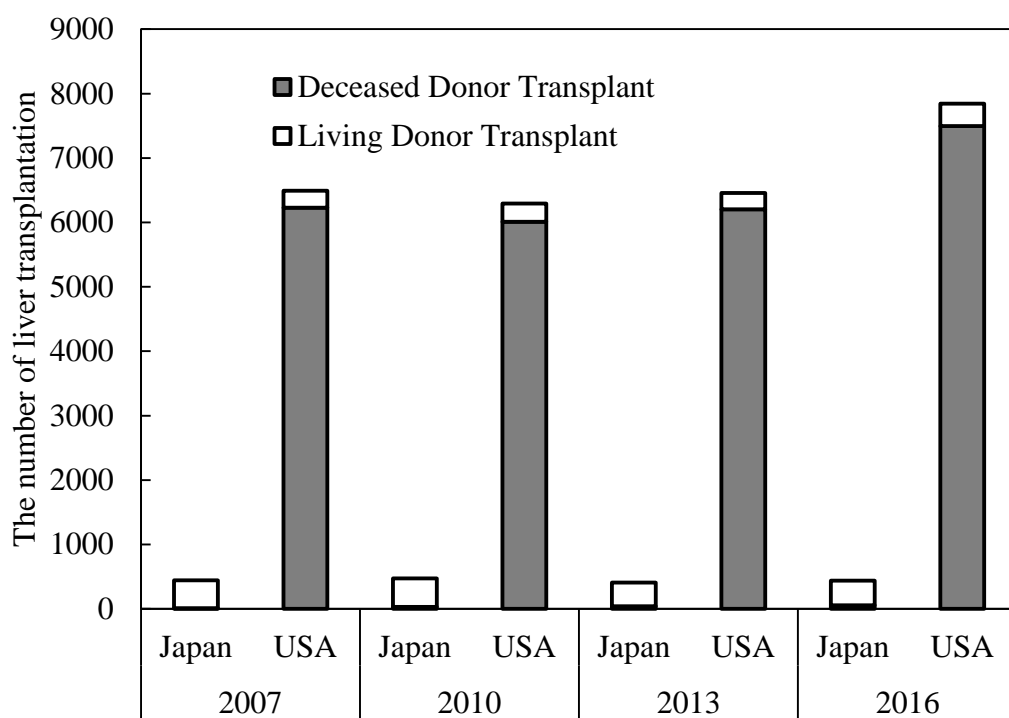


Fig. 1.2.2 The number of liver transplantation in Japan and USA

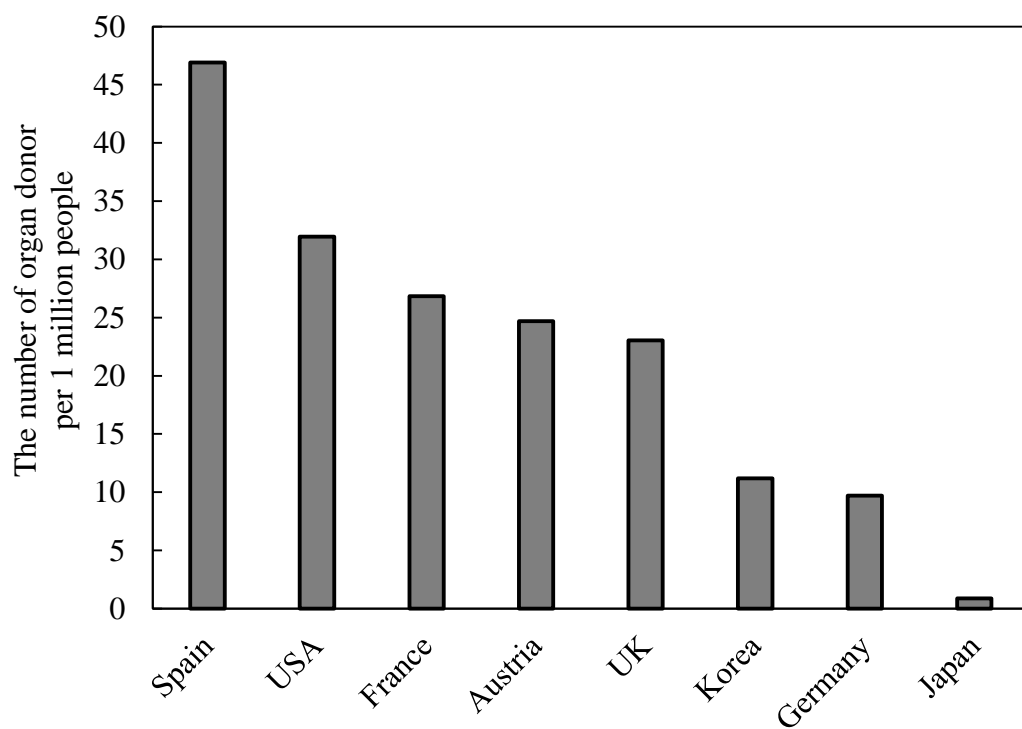


Fig. 1.2.3 The number of organ donor per 1 million people in 2017

1.3 移植不適合臓器（マージナルドナー）

前述の通り，現在の日本国内における肝移植は脳死肝移植のドナー不足であることから生体肝移植が主流であるが，ドナーへの負担，倫理的問題を考慮すると，今後は生体ドナーに依存しない，死体肝移植の拡大が重要であるとされている．そのような背景を受けて，近年ではドナー不足の解決に向けて，マージナルドナーからの移植が世界中から注目を集めている．標準的ドナー条件を満たさないという意味のマージナルドナーという言葉は，高齢者ドナーおよび腎臓において限られた施設のみで行われていた心停止ドナーをあわせて用いられるようになった．このマージナルドナーを移植に用いることができればドナー不足解消へ向かうのだが，一般にマージナルドナーを移植する場合，強度の虚血再灌流障害，引き続く移植後無機能あるいは遷延性機能不全，さらに脳死状態に出現する非特異的な炎症反応が拒絶反応を引き起こすなどのリスクがある⁽⁷⁾．

死体から臓器を摘出して体外で保存する場合，臓器は後述する過程において障害を受ける．

1.3.1 温阻血障害

温阻血障害は，心停止から臓器摘出までに至る障害である．臓器の障害機序としては，血流停止により酸素をはじめとして代謝を維持するうえで必要な物質の供給が断たれるため ATP の合成が低下し，細胞膜の Na, K ポンプ機能が低下して細胞の浮腫を招く．また，不活性化酸素を活性化し細胞は自己融解を起こす．

1.3.2 虚血再灌流障害

移植臓器は体外で保存されている間も障害を受けるが，その結果として再灌流障害が生ずる．血流再開後に再酸素化されることによって組織障害を起こす．そ

のメカニズムの詳細は必ずしも明らかではないが、好中球、フリーラジカル、接着分子、サイトカインなど複雑に複数の因子が関与しているとされている。病態のひとつは血流再開後、微小血管に接着分子が発現し、ラジカルを発生することにある。その結果、微小血管に血栓形成などが生じ微小循環が障害され、細胞障害、特に内皮系細胞を標的に障害が起こる事態に進展する⁽⁷⁾。

1.4 分割肝移植

分割肝移植は、成人脳死肝移植ドナーグラフトを2つに肝切除して分割し、2人のレシピエントに移植する手技である。これは前述のドナー不足解消への手段の一つとして、単純にドナープールを拡大するだけではなく、環境の極めて厳しい小児脳死臓器移植における臓器不足解消の切り札として高い注目を集めている(Fig.1.4.1)。分割肝移植は、1988年に Pichlmayr らが、1つの肝を分割して1人の脳死ドナーから、2人のレシピエントに移植したのは始まりであり、現在欧米を中心に積極的にこの手技が導入されている⁽⁸⁾。日本国内においても、2015年12月までの360例の脳死ドナー提供のうち、23例(6.4%)に分割肝移植が施工されており、良好な成績を残している⁽⁹⁾。

分割肝移植の分割法としては、ドナーの体内にて分割する体内分割法(in-situ split procedure)と、ドナーから全肝臓を摘出した後、体外の back table にて分割する体外分割法(ex-vivo split procedure)法に大別される。体内分割法は、血流のある状態で手術操作を行うことから、健全な臓器機能を維持した状態で作業を行える一方で、分割処理に伴う手術操作時間の延長や、出血量増加に伴うドナー循環動態への悪影響、さらには他臓器への影響に課題を有する。そのため、現在では多臓器摘出への影響を考慮し、一般的には体外分割法が選択される。一方でこの体外分割法も、体内から摘出後に分割処理を行うため、全肝の場合と比した阻血時間の延長や温度管理の制限、small-for-size graft による臓器機能の低下、また脈管・胆管再建に関する外科的合併症の増加など多くの課題を有しているのが現状である⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。

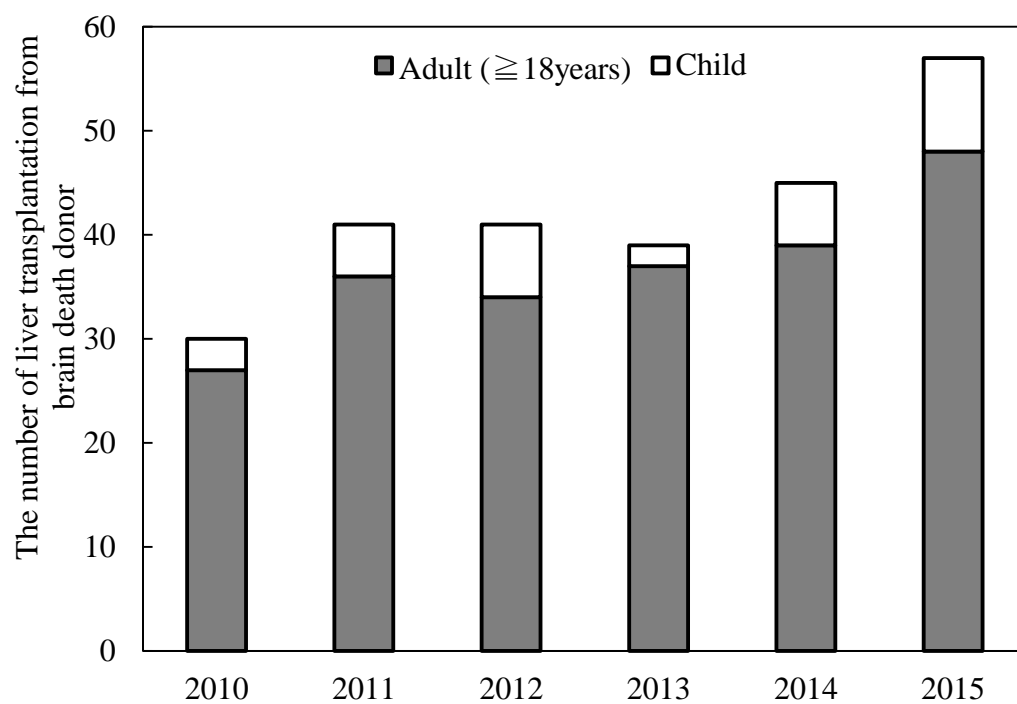


Fig. 1.4.1 The number of liver transplantation for adults and children from brain death donor

1.5 体外臓器保存法

摘出された臓器は移植までに体外で保存されるが、その際の保存法は単純冷却保存法と機械灌流保存法がある。現在一般的に使われているのは簡便かつ安価であるといった理由から、氷温の保存液に浸けて保存する単純冷却保存であるが、あくまで機能維持を目的としているため、障害を受けた臓器、いわゆるマージナルドナーについての機能回復の見込みは薄い。そこで近年では、マージナルドナーの拡大に向けた臓器機能回復、評価のため、臓器機械灌流法が注目を集めている(Fig.1.5.1)。これは持続的にポンプで栄養溶液の灌流を行い、細胞エネルギーを回復するためのエネルギー基質の供給と同時に、毒性代謝産物を除去できるといった利点を有する方法である⁽¹²⁾⁽¹³⁾。さらに灌流保存中の流量や灌流圧などの流動動態や、保存液中の成分分析などから行う移植前の臓器機能評価についても大きな期待が寄せられている⁽¹⁴⁾⁽¹⁵⁾。現在では欧米を中心に臨床応用が進められており、臓器保存・再生・評価の観点からその有用性が多数報告されている⁽¹⁶⁾⁻⁽²¹⁾(Fig.1.5.2)。

一方で、より優れた臓器再生や移植前機能評価のためには、保存中の代謝機能などの肝臓機能や、その再生のメカニズムに不明瞭な点も多いことから、温度条件や酸素供給条件を始めとした灌流条件について、世界中で議論が続いている。

例えば温度領域の観点では、臓器の代謝が抑制し機能が停止する低温域(4-8℃)、少し温度が上がり、代謝が下がるが生物学的には部分的な機能状態を有する室温度域(20-33℃)、生物学的に完全な機能状態を有し、体温に最も近い恒温域(37℃)など幅広い温度域での研究が行われている。しかしながら、肝臓機械灌流法において保存温度は重要課題であるが、現状では最適な温度や状態は明らかになっていない。灌流保存の分野において研究されている主な温度域とその特徴を以下に述べる。

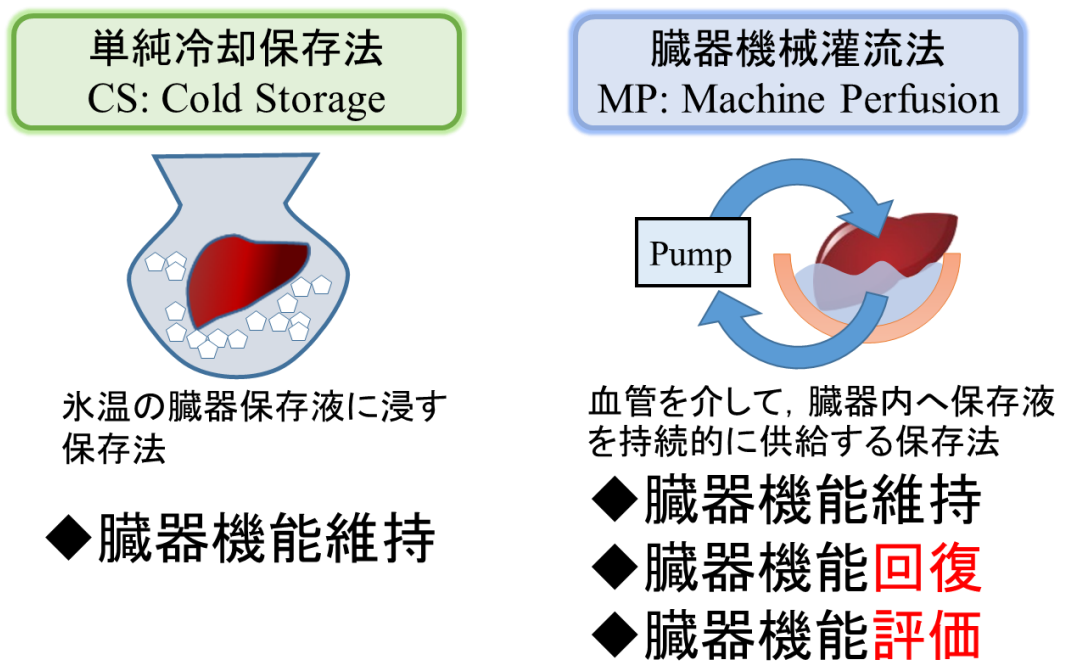


Fig. 1.5.1 Organ Preservation Methods



(a) Life Port (USA) ⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾



(b) Organ OX (UK) ⁽¹⁸⁾⁽¹⁹⁾



(c) Liver Assist (NLD) ⁽²⁰⁾⁽²¹⁾

Fig. 1.5.2 Some kinds of commercial machine perfusion system

1.5.1 低温機械灌流法 (HMP; Hypothermic Machine Perfusion)

現時点で、臨床腎臓移植における最も広く用いられる灌流技術である。低温灌流は移植において単純冷却保存と比較し、無作為化された試験によって臓器機能の低下率が検証され有用性を示し、広く応用されている⁽²²⁾。肝移植における有望な前臨床研究は、標準的な臓器や ECD (extended criteria donors), DCD (donation after cardiac death) 臓器において、低温灌流の利点や安全性をフェイズ 1 試験することで段階的に検証されている⁽¹⁶⁾⁽²³⁾⁻⁽²⁶⁾。低温灌流の利点は、低代謝率中における細胞エネルギーの回復や、肝臓や胆管微小循環の灌流の改善、炎症性メディエーター生成の低減、機械不良の際の安全性の増加などを示した⁽²³⁾⁻⁽²⁵⁾。炎症性メディエーターとは、損傷された組織、および炎症部位に浸潤した白血球や肥満細胞、マクロファージなどから放出される生理活性物質であり、血管透過性亢進や組織破壊などを引き起こすものである⁽²⁷⁾⁻⁽²⁹⁾。

人間への臨床応用は 2010 年にはすでに行われており、Guarrera らは酸素化をしない低温灌流を施した肝臓 20 例について移植を行い、単純冷却によって保存された臓器移植の過去の対照群と比較したものを報告した。低温灌流群は肝機能の評価指標となる逸脱酵素や同種移植機能不全の減少傾向、および病院待機日数の減少を示し、初期の臓器不全は発生しなかった。したがって、この報告は臨床利用のための低温灌流の実現可能性と安全性を確立し、臨床への利益があることを示唆した⁽²⁴⁾。2014 年には、Dutkowski らが平均 38 分間の温阻血時間を経た DCD 臓器 8 例について、低温酸素化灌流 (HOPE, hypothermic oxygenated perfusion) を行い、再灌流障害、胆管障害が DBD(donated after brain death)臓器と同程度まで軽減可能という、最初の報告を行った⁽²⁵⁾。2018 年には、Schlegel らが DCD 臓器に対する低温酸素化灌流に対して 5 年間のフェローアップ研究を報告し、血行力学的な安定性や乳酸クリアランス、血管合併症や移植後機能不全など

で良好な結果を示し、移植から 5 年後のグラフト生存率は有意に上昇を示し、その有効性を証明した⁽²⁶⁾。

1.5.2 室温機械灌流法 (Subnormothermic Machine Perfusion)

低温での肝臓灌流は保存障害及び虚血再灌流障害を減少させるのに効果的であることが示されてきたが、この条件下では代謝活性が有意に減少し、移植前の臓器機能を評価する能力は制限されてしまう。そのため、近年ではいくつかのグループが室温 (20-33℃) へ機械灌流の温度を上昇させる効果を検討した⁽³⁰⁾⁻⁽³³⁾。低温と体温の中間温度では、臓器細胞や代謝活性は大幅に増加されるため、移植前の臓器機能の評価を低温に比べ容易にする。室温灌流の他の理論的な利点は、体温域 (37℃) と比較して低い温度であるために酸素溶解度が増加し、酸素運搬体、特に赤血球を必要としない灌流液の使用を容易にすることである。ラット肝臓における最近の報告では、低温 (8℃)、室温 (20℃)、および 8℃から 20℃まで徐々に増加させる制御復温下 (20 分かけて 20℃へ) において、DCD 臓器 (30 分温虚血) の機械灌流の効果を検討したものがあり、単純冷却と比較して、すべての機械灌流群でミトコンドリア酸素消費量、ミトコンドリア生存率、細胞 ATP、胆汁生産、細胞障害 (AST、ALT、LDH)、および組織学的壊死の改善を実証した⁽³⁴⁾⁽³⁵⁾。

2014 年には、Bruinsma らは人間の廃棄された 7 つの臓器 (心停止ドナーから 5、脳死ドナーから 2) での経験を報告した。この報告での室温灌流は無血の灌流液を用いて 21℃で 3 時間行い評価され、酸素消費量及び胆汁生成の増加、肝細胞の ATP 量増加など、臓器機能の改善を示唆した。組織学的分析は、肝細胞の形態および類洞内皮の保存を実証した⁽²⁰⁾。

また近年では、室温灌流保存法の高度化に向けて人工酸素運搬体含有灌流液

による保存も注目を集めている⁽³⁶⁾。人工酸素運搬体は、高い酸素運搬能を有しながら、赤血球と比し血液型を持たず、感染のリスクもないことから、従来の灌流液に添加することで、恒温灌流保存法における灌流液に用いる血液の代替や、室温灌流保存法の最適化に向けて期待は高く、実際にいくつかの研究チームにより、肝障害の低減や、移植後のグラフト生存率の向上、そして安全な灌流保存が可能となることが証明されている⁽³⁷⁾⁽³⁸⁾。

研究報告数は低温灌流に劣るが、このように室温域での灌流も脚光を浴びつつあり、温度上昇により代謝を活性化させ臓器機能を回復させようという動きが見られている。

1.5.3 恒温機械灌流法 (NMP; Normothermic machine Perfusion)

室温域よりもさらに温度が高い恒温灌流保存（37-39℃）は、正常体温下であるが故に冷温保存やそれに付随する保存障害の最小化、生理学的条件下での迅速な臓器の回復、臓器機能を評価する能力といった利点が期待される保存法である⁽³⁹⁾⁻⁽⁴²⁾。2013年には、トロント大学の Boehnert らは、単純冷却後の NMP の影響を評価することで DCD 実験の結果を報告した。研究では、臓器は、1 時間の体内温虚血の後に 4 時間単純冷却か単純冷却 4 時間に 8 時間の NMP を加えたいずれかが行われ、恒温灌流保存された臓器は、ALT の低値、多くの生理的胆汁組成物、および少ない胆管壊死を示した。さらに CT 血管造影が臓器で行われ、優れた肝動脈灌流も実証した⁽³⁹⁾。

体温灌流のヒトの研究は移植に適さない廃棄された臓器の灌流から始まり、2013 年に Op den Dries らは廃棄された 4 つの DCD 臓器に 6 時間の恒温灌流を行なった。結果として、胆汁の生産や乳酸値の減少といった臓器機能の臨床的な証拠を示し、組織学的分析は、肝臓構造が良好であったことを示した⁽⁴³⁾。こういっ

た前臨床研究からの結果に基づいて、2016年には Peter らによって恒温灌流の臨床応用が報告された。この報告では、標準的な単純冷却保存後に移植された対照群と比較し、30日間の生存率（100% NMP vs 97% CS）やAST最大値の有意な改善が認められた。この報告で重要なことは20回の実験で装置に関連する不具合がなく、この試験が安全であることが示されたことである⁽⁴⁴⁾⁽⁴⁵⁾。また2018年には、Nasralla らにより、欧州にて行われた無作為化対照試験の結果が報告された。この報告では、同様に恒温灌流保存後に移植された群(N=121)を、単純冷却保存後に移植された対照群(N=101)との比較を行い、50%以上のグラフト廃棄率の低下や平均保存時間の増加、肝機能障害の低下を示し、臨床における恒温灌流保存の優位性を証明した⁽¹⁸⁾。

これまでは低温や室温灌流と比べて、血液を用いることで装置回路内の血栓形成など従来とは予期せぬ問題が孕んでいたが、恒温灌流に関しても安全であることがこれらの研究により、証明された。このように従来の単純冷却のような低い温度域だけの範囲ではなく、灌流温度の研究分野は議論され続けている。

1.6 臓器機械灌流法における移植前臓器機能評価

肝移植における，グラフトの移植前機能評価は移植後のグラフト生存率や臓器機能を向上させるためには必要不可欠である．特に近年死体肝移植が推進されていることから，マージナルドナーの拡大に向け，これまで以上に高精度，かつ迅速な臓器機能評価が求められている⁽¹⁴⁾．

このような背景を受けて，前述のように機械灌流法による灌流中に得られる指標から行う移植前評価手法が注目を集め，世界中で多数の報告がなされている(Table.1.7.1)．肝移植においては肝機能の指標となる灌流液中の逸脱酵素(AST, LDH, ALP et al.)を始めとして，血液ガス分析(pH, lactate level, glucose, CO₂ et al.)による評価，灌流圧や血管圧力などの流動評価，ATP などの組織学的な評価法など，幅広い観点から検討されている⁽⁴⁸⁾⁻⁽⁵⁴⁾．特に近年では肝細胞の代謝物である胆汁に注目し，その生成量や成分から肝機能の評価法が，代謝機能を中心に活発な議論が行われている⁽⁴³⁾．

しかしながら，肝臓が有する複雑な構造や，多様な因子が絡む肝臓機能から，現状で実用的といえる手法は組織学的な評価を始めとした生化学的な評価がほとんどであり，灌流中の指標の動態を用いた評価法は確立されていないのが現状である．

Table 1.6.1 The study of viability assessment for liver graft by machine perfusion

Study	Journal	Year	MP type	Organ	Markers
Henry et al. ⁽²⁷⁾	Am J Transplant	2012	HMP	Human	tissue
Op den Dries et al. ⁽⁴³⁾	Am J Transplant	2013	NMP	Human	Enzymes, lactate levels, bile production, bile component
Guarrera et al. ⁽¹⁶⁾	Am J Transplant	2015	HMP	Human	Enzymes, tissue
H. Mergental et al. ⁽⁴⁶⁾	Am J Transplant	2016	NMP	Human	Enzymes, lactate levels, tissue
H. Abudhaise et al. ⁽⁴⁷⁾	PLoS ONE	2018	HMP	Human	Resistance, Flow Rate, Enzymes, tissue
St Peter et al. ⁽⁴⁸⁾	Br J Surg	2002	NMP	Porcine	Enzymes, glucose, bile production, tissue
Jain et al. ⁽⁴⁹⁾	Transplantation	2005	HMP	Porcine	Enzymes, Oxy. Consumption, Bile production
Xu et al. ⁽⁵⁰⁾	J Surg Res	2012	NMP	Porcine	Enzymes, bile production, Oxy. Consumption, tissue
Schlegel et al. ⁽⁵¹⁾	J Hepatol	2013	HMP	Porcine	Enzymes, CO2, tissue
Minor et al. ⁽⁵²⁾	Am J Transplant	2013	COR vs HMP/SNMP	Porcine	Enzymes, Oxy. Consumption, tissue
Liu et al. ⁽⁵³⁾	Am J Transplant	2016	NMP	Porcine	Resistance, Enzymes, lactate level, Bile production, Oxy. Consumption,
Hoyer et al. ⁽⁵⁴⁾	Liver Transplant	2016	COR vs NMP	Porcine	Resistance, Enzymes, lactate level, Bile production, Oxy. Consumption, tissue
Banan et al. ⁽⁴⁰⁾	Liver Transplant	2016	RMP	Porcine	Enzymes, lactate level, pH, bile production, tissue

1.7 目的

1.5 章で述べたように臓器機械灌流法は、従来用いられてきた単純冷却保存法と比べて肝臓機能再生や移植前機能評価に大きく期待されている手法である。特に肝移植における深刻なドナー不足の解消のための、マージナルドナー拡大に向けて求められる役割は大きいといえる。しかしながら、臓器機械灌流法は灌流温度や酸素供給、流量や圧力などの流動条件から灌流液の液性因子など、最適な肝臓の保存・再生を行うためには制御すべきパラメータが多いこと、また肝臓の機能や構造は、非常に多様な因子が関連していることから、最適な保存条件は明らかになっていない。さらに安全にマージナルドナー拡大に向けて、最重要課題ともいえる移植前機能評価法も確立されていないのが現状である。

外科領域では虚血再灌流障害を克服することが永遠のテーマであり、臓器機械灌流法はその可能性を秘めている。臓器再生による虚血再灌流障害の抑制はもちろんのこと、移植前の虚血再灌流障害が予測可能となれば、これまで以上に高水準で安全な移植が可能となり、マージナルドナーからの移植においてもリスクを軽減することができる。また現行の規定では、臓器移植が成功後、臓器が正常に機能しなかった場合でも臓器待機日数は 0 となり、再び移植の順番が回ってくるのを待たなくてはならないため、移植後の臓器が正常に機能するかどうかを知ることは非常に重要であるといえる。

以上のような背景を受けて、本研究では臓器機械灌流法を用いたドナープールの拡大、および安全で高水準な移植の確立に向けて検討を行った。特にマージナルドナーの再生・評価法の確立による移植医療の拡大に向けて、心停止後肝臓、および分割肝グラフトに注目し、臓器機械灌流法による臓器機能の保存・再生、および従来の指標に加えて、灌流中の代謝因子動態に注目した移植前機能評価法を検討し、以下の事柄について実験を行った(Fig.1.8.1)。

- 室温機械灌流法による心停止後肝臓の保存・機能再生.
- 人工酸素運搬体含有灌流液を用いた室温灌流保存法による, 心停止後肝臓の保存・機能再生.
- 分割肝移植における術中の阻血時間短縮・温度管理が可能な低温機械灌流法適用による障害軽減.
- pH や酸素消費量などの, 灌流中に得られる肝臓代謝因子に注目した移植前機能評価法の確立.
- ICG 蛍光法による, 灌流中における肝臓の代謝動態評価法の確立.

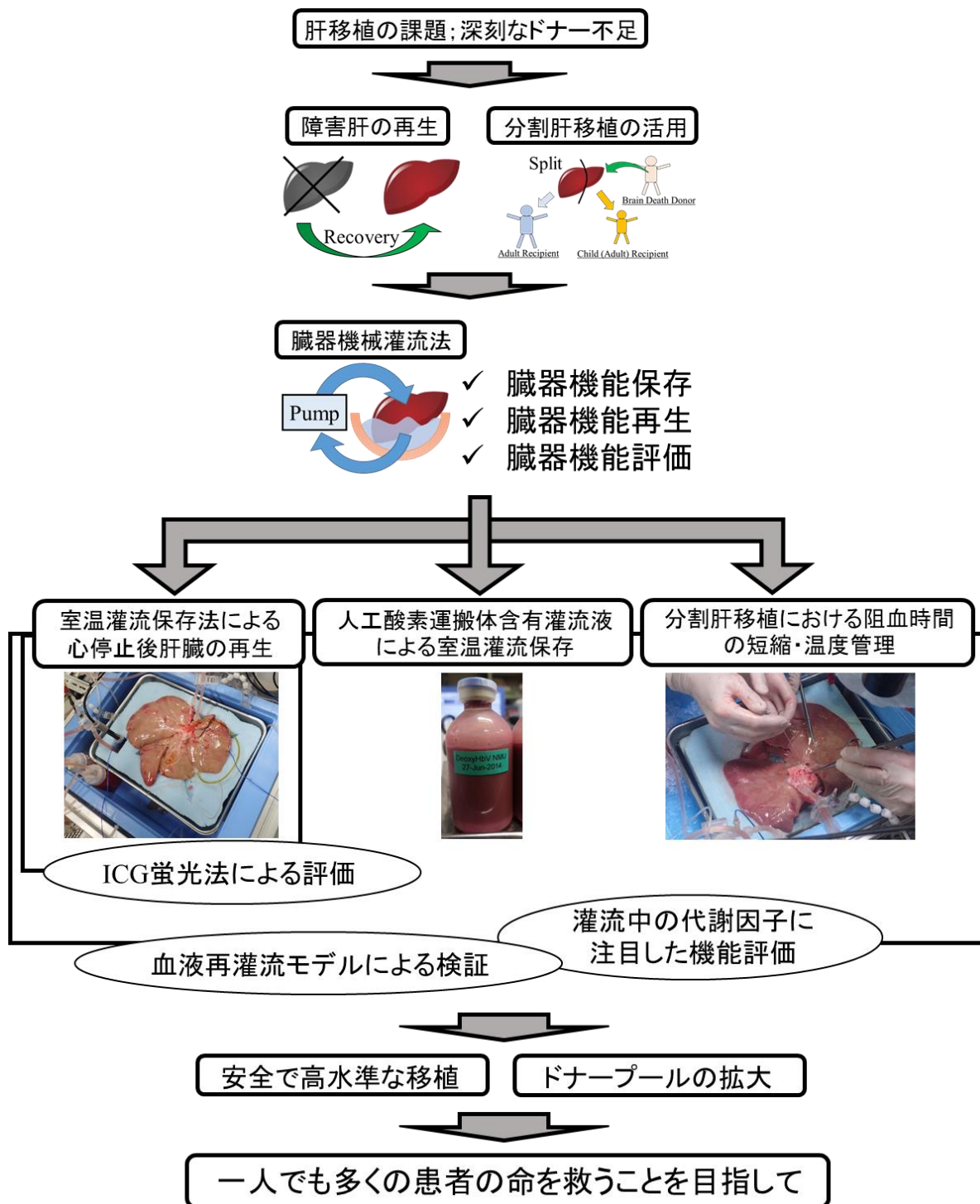


Fig. 1.7.1 An overall picture of the objectives in this study

二章 理論

2.1 灌流中の各種評価指標

2.1.1 血管圧力・抵抗

血管圧量は、血流に対する臓器が有する圧力調整能や血管内皮障害、あるいは微小循環における血栓形成の予測など、臨床的にも流動評価指標として広く用いられる指標であり、特に移植医療における最重要課題である虚血再灌流障害においても、その程度を評価するための重要な評価項目とされている⁽⁵⁵⁾。

一方で、これは臓器の個体差や灌流量を考慮されていない。そこで流体力学的観点から普遍的な流動指標として用いるために、血管内流動をポアズイユ流れと仮定することで血管抵抗を算出する。

$$Q = [(\pi r^4)/8\eta] \cdot [P/l] \quad [\text{ml/min}] \quad (2.1)$$

Q; 血管流量, P; 血管圧力, r; 血管系, η ; 灌流液粘度, l; 長さ

ここで血管抵抗は主に血管系の収縮により調整され、灌流液粘度に依存するが、ここでは灌流液粘度が一定であることから、血管抵抗 $VR=8\eta/\pi r^4$ と置くことで、血管抵抗について(2.1)式を整理する。

$$VR = P/(Q/l) \quad [\text{mmHg}/((\text{ml/min})/\text{m})] \quad (2.2)$$

さらに、本研究では血管長さを定義することが困難であることから、血管長さと肝重量の比率が一定であると仮定することで、臓器の個体差や灌流条件によらず普遍的に評価が可能な、相対的な流動評価指標として血管抵抗 R を(2.3)式に定義した。

$$VR = P/(Q/m) \quad [\text{mmHg}/((\text{ml/min})/100\text{g liver})] \quad (2.3)$$

VR; Vascular resistance, 血管抵抗, P; 血管圧力 [mmHg],

Q; 灌流流量[ml/min], m; 灌流前の単位当たりの肝重量[100g liver]

本研究ではこの血管抵抗、およびその要素となる灌流流量と血管圧力を、機械灌流法における流動指標として定義した。

2.1.2 灌流液のバイオマーカー

本研究では、灌流中に適宜採取した灌流液の逸脱酵素測定、血液ガス分析を実施し、各種指標を肝機能のバイオマーカーとして使用した。

逸脱酵素は、本来細胞内で働いている酵素が何らかの理由で血液中に流出したものである。流出する理由としては、細胞自体の破壊や細胞膜の透過性亢進などによるもので、多くの場合は組織障害に由来している。临床上、逸脱酵素の血中濃度を測定することで臓器機能を推測することが可能で、臨床検査の一環として頻繁に行われている。単位は[IU/L]として、薬剤の生体への効果量から定義される基本単位量を基準とした量を示しており、国際生化学学会の定義（1964年）にもとづき国際単位（International unit）として定義されるものであり、その値が多いほど逸脱している量も多いことを示している。

以下に、本研究でバイオマーカーとして用いた逸脱酵素、血液ガス分析項目の詳細について示すが、基本的に逸脱酵素は灌流中に臓器の細胞が破壊された際に流出することから、値が高値になるほど臓器機能障害の進行が予想され、血液ガス分析項目については、一般的に生体内の酸塩基平衡を評価していることから、適性値内であることが臓器機能の健全性が予想される。

- AST（アスパラギン酸アミノ基転移酵素, Aspartate Aminotransferase）

アミノ酸代謝に関与している酵素。肝細胞をはじめとして赤血球、心筋、骨格筋などに分布する。機械灌流中の指標としては、肝細胞が破壊された際に逸脱することから、肝機能指標として用いる。

- LDH（乳酸脱水素酵素, Lactate Dehydrogenase）

体内で糖分がエネルギーに転換されるときにはたらく酵素の一種。ほとんどあらゆる細胞に含まれているが、肝臓や腎臓、心筋、骨格筋、赤血球などに

多く含まれている。機械灌流中の指標としては、AST と同様に肝細胞が破壊された際に逸脱することから、肝機能指標として用いる。

- HA（ヒアルロン酸, Hyaluronic Acid）

細胞と細胞の間に多く存在し、水分の保持やクッションのような役割で細胞を保守している。临床上では肝臓の線維化によりヒアルロン酸の分解能力が低下することで、血中で高値となることから肝線維化マーカーとして用いられているが、機械灌流中の指標としては特に類洞内皮が破壊されたことで流出することから、類洞内皮障害の指標として用いる。

- ALP（アルカリホスファターゼ, Alkaline Phosphatase）

体内でリン酸化合物を分解する働きのある酵素。毛細胆管に多く存在し、胆汁中にもみられる。基本的には肝細胞で生成され、そのほとんどが胆汁から排出されるが、肝障害により胆汁の流れが悪くなると血液中に漏れ出すことから、胆管障害の指標として用いる。

- Lactate（乳酸）

乳酸の解離で生じる陰イオンであり、グルコースの細胞内代謝産物。組織の酸素需要と酸素供給間の不均衡を示唆する指標であり、細胞の酸素レベルの低下や、ミトコンドリアが適切な機能を失うことで酸塩基平衡の破綻、乳酸アシドーシスの進行により、Lactate 濃度は高値を示す。

- Glucose（血糖）

生体が一般的に用いる生命活動のエネルギーであり、ミトコンドリアの代謝により生成される。通称ブドウ糖。臨床的にはインスリンを始めとしたホルモンによる諸因子により調整されることから、糖尿病を中心としたホルモン調整因子の疾患への指標に用いられる。灌流中の指標としては、肝代謝機能指標として用いる。

2.1.3 代謝因子

一般的に臓器再生の尺度である，肝臓代謝機能や細胞レベルでのエネルギーバランスは，生検組織診断による ATP 濃度により評価される⁽⁵⁶⁾．一方で，この評価手法では，生検採取による臓器への障害や迅速な臓器機能の診断に課題を有している．そこで，本研究では灌流中に経時的に得られる代謝因子に注目し，ATP 合成能を予想することで，肝臓代謝機能の評価する．今回は，特に灌流中の酸素消費量と液中の pH，およびこれらの環境要因となる保存温度について注目した．

一般に，ミトコンドリアによる糖代謝は，プロトン駆動力と呼ばれる H^+ の電気化学的ポテンシャル差によって進行し，最終的には酸素消費を伴った化学反応によって ATP が合成される．このプロトン駆動力は真核細胞ではミトコンドリア内膜における H^+ の電気化学的ポテンシャル差，つまり(2.4)式に示すように，膜電位と水素イオン濃度の膜内外での差によって決定される．

$$\Delta\tilde{\mu}_{H^+} = F\Delta\phi - 2.3RT\Delta pH \quad [J/mol] \quad (2.4)$$

Mitchell らは，ATP 合成の中間における機構は，このポテンシャル差により駆動されることを明らかにし（化学浸透圧説），この式を変形することでプロトン駆動力の関係式を定義した⁽⁵³⁾(2.5)．

$$\Delta p = \Delta\tilde{\mu}_{H^+}/F = \Delta\phi - 2.3RT/F \cdot \Delta pH \quad [V] \quad (2.5)$$

$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$; H^+ の電気化学的ポテンシャル差， Δp ; プロトン駆動力

$F = 96445.33 [C/mol]$; ファラデー定数， $\Delta\phi = -70.15 [mV]$; 膜電位，
 $R = 8.314 [J/(K \cdot mol)]$; 気体定数， $T [K]$; 絶対温度， $\Delta pH [-]$; 膜内外の pH 差

一方でこのプロトン駆動力はあくまで単一細胞スケールでの評価指標であること，加えてこれの測定には細胞内におけるミトコンドリア内外での pH 計測

が必要であり，非常に高度な技術が求められることから，臓器の代謝機能を評価するためには課題が多い．しかしながら，組織内での pH，つまり H⁺濃度が肝臓代謝機能に与える影響は明白であることから，本研究では簡易に測定可能な灌流液中の pH に注目してプロトン駆動力の関係式に適用し，基準値との比較による相対的な中間代謝の指標であるプロトン指標を(2.6)式に定義した．

$$\Delta p' = \Delta \phi - 2.3RT / F \cdot (pH_n - pH_0) \quad [\text{V}] \quad (2.6)$$

$\Delta p'$ ；プロトン指数 F ；ファラデー定数， $\Delta \phi$ ；膜電位， R ；気体定数， T [K]；灌流液の温度（絶対温度）， pH_n [-]；灌流液中の pH， pH_0 [-]；初期 pH(7.4)

加えて，前述のとおりミトコンドリアにおける糖代謝では，ATP の産生に中間代謝を駆動するプロトン駆動力，および最終的な化学反応を行う酸素消費に依存して進行することから，本研究では肝臓酸素消費量，および基準値に対するプロトン指数から肝臓代謝指数を(2.7)式に定義し，ATP 合成能，肝臓代謝の評価指標として提案，およびその有用性を検証した．

$$k_n = O_x \cdot [1 + (\Delta p_0 - \Delta p_n) / \Delta p_0] \quad [\text{mol/min/100g liver}] \quad (2.7)$$

k_n ；肝臓代謝指数， O_x ；単位肝重量辺りの酸素消費量 [mol/min/100g liver]，

$\Delta p'_n$ ；対象臓器のプロトン指数， $\Delta p'_0$ ；基準臓器のプロトン指数

2.2 ICG 蛍光観察

臨床で副作用の少ない薬剤として汎用されているインドシアニングリーン (ICG; Indocyanine Green) は, 750-810nm の光の励起で, ピーク波長 845nm の蛍光を発する (Fig.2.2.1). この生体透過性に優れた ICG の蛍光を観察することにより, 現在では診断治療に広い範囲で応用されている. ICG は血清タンパクと結合すると即時に蛍光特性を示すことから, 近赤外線観察カメラを用いることでリアルタイムに ICG の流れを観察することができる⁽⁵⁷⁾.

一方で前述の通り生体内での ICG の蛍光のピーク波長が 845nm の近赤外領域にあることから, 蛍光画像を直接的に肉眼で観察することはできない. そこで撮像手段として近赤外領域での感度を有する CCD などが用いられるが, この生体光計測は可視光領域の蛍光測定と比し, 自家蛍光の影響を受けにくいことや, 10mm 程度までの生体深部の情報を得られることが利点として挙げられる.

肝臓機械灌流法においては再灌流液に含まれる血液中の血清蛋白質との結合による臓器内流動の可視化, および血中の ICG は肝実質細胞に取り込まれ, 代謝されずに胆汁に排泄されることを利用して, 肝臓代謝機能の分布のマーカーとして用いる.

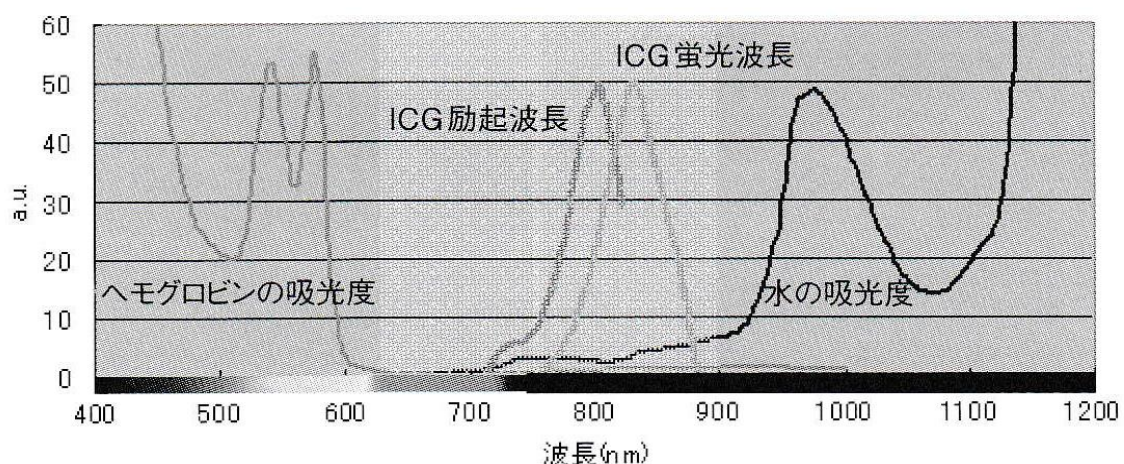


Fig. 2.2.1 Absorption spectra of hemoglobin and water and ICG⁽⁵⁴⁾

2.3 胆管圧測定

1.7 章に示した通り，機械灌流法における移植前機能評価に向けて多数の指標が報告されているが，近年特に注目を集めているのが胆汁生成量，およびその成分分析である．前述のとおり，胆汁は肝細胞の代謝物として生成されるものであることから，肝臓代謝機能の評価指標としての役割はもちろん，移植後の胆管合併症を予測するための胆管流動指標としても大きな期待が寄せられており，実際にその有用性が報告されている⁽⁴³⁾⁽⁵⁴⁾．一方で，胆管は非常に微細な構造を有しており，管径も極小であることから，胆汁を採取するための胆管カテーテルの挿入角度や内径，あるいはその挿入技術が胆汁生成量に大きな影響を与えられている．加えて胆汁は水と比し高い粘度を有することから，胆汁生成量が少量であっても，必ずしも健全な代謝機能や胆管流動が欠如しているわけではないとして，課題を有しているのが現状である⁽⁵⁸⁾⁽⁵⁹⁾．

そこで，本研究では技術的，環境的な要因に依存せずに評価が可能な，胆管圧力による評価法の検討を行った．胆管圧力は胆汁採取時と同様に総胆管にカテーテルを挿入し，その圧力を測定することで，胆汁生成によって生じる流れと，胆管内で胆汁を運搬するために生じる流れによる，二つの要因による胆管流動指標として定義し，評価指標としての可能性を検討した．

三章 実験方法

3.1 実験装置・動物

本実験には体重 15-25kg 程度の雑種ブタを用いて、実験条件に合わせて調整した温阻血時間にて肝臓を摘出して使用した。摘出後には速やかにバックテーブルにてユーロコリンズ液(EC; Euro Collins)による脱血を行い、肝臓が有する 2 つの血管にコネクター (PV : VRM506 ; アイシス, HA : VR206) によるカニュレーションをおこない、灌流装置の流入チューブと着脱可能な処理を施した。

灌流装置は独自に作成したものを使用し、チュービングポンプ (Master Flex 7520-40; Cole-Parmer, USA), エアトラップ, 流量計 (PV : VN05; Aichi Tokei, Japan, HA : FD-SS02; Keyence, Japan), 圧力計 (KL76; Nagano Keiki, Japan), 酸素添加装置 (人工肺 HP0-06 H-C ; 泉工医科工業), 温調装置 (MF-0-K; Toa Denki, Japan), 酸素濃度測定器, 肝臓ホルダーで構成される⁽⁶⁰⁾ (Fig.3.1.1). 肝臓温度は基本的に肝臓の左葉側の 2 葉 (Left lateral lobe, Left median lobe) に熱電対を挿入し、灌流中の肝臓温度の代表値とした。流入経路は肝臓の特徴である二重血管支配に準じ、門脈 (PV) と肝動脈 (HA) で独立しており、灌流流量は体内での血流量を模擬しおよそ門脈 7 割, 肝動脈 3 割に振り分け、基本的には一定流量による灌流とし、過度に血管圧力が上昇する場合のみ適宜調整した。流出する静脈側では、チューブ接続による閉塞により肝臓内圧が高くなることが懸念されるため、自由流出とした。また、エアトラップをポンプの下流側に設置することによって肝臓へ気泡が入らないようにし、エアトラップの水位を調節することで門脈側では拍動を抑制し、肝動脈側では拍動を残した。肝臓は発泡スチロール, またはスタイロフォームで作成したホルダーの上に置かれ、静止される状態で保持した (Fig.3.1.2)。

灌流液中の酸素濃度測定は Ocean Optics の Neo Fox フェーズ測定システムを使用した。酸素分圧を測定するために sol-gel における化学的複合体の蛍光を用

いている．三重項としての酸素は，特定の発光体の蛍光と燐光を効率的に消す事ができ，この影響は動的蛍光消失と呼ばれている．これを利用し酸素濃度を測定している．測定するためにはセンサーの校正が必要であり，酸素濃度の基準となる 0%を脱酸素剤を適量添加した水道水，100%を大気圧で飽和させた水道水に設定した．酸素センサーは肝臓上流側では主流となる門脈回路中の肝臓上流側に，下流側では静脈から流出した灌流液を再び吸い上げる回路から，人工肺より下流側に設置した．酸素消費量の算出においては，100%の濃度を 1 気圧蒸留水での飽和溶存酸素量として，計測した酸素濃度，およびその時点での総灌流量から酸素供給量，流出量を分子量として算出，供給量と流出量の差分を単位当たりの肝重量で除すことで，肝重量当たりの酸素消費量[mol/min/100g liver]として定義した．

液中成分を測定するための灌流液の採取は，灌流初期に測定する液は肝臓から排出された濃度が薄すぎることや濃すぎることでデータが安定しないため，灌流初期の逸脱酵素を採取する際には灌流開始から 2-3 分の間を空けて静脈近傍からチューブで採取した．

胆管圧測定のために，胆管にはエクステンションチューブ(X2-WL50; トップ)を挿入した．エクステンションチューブは，総胆管にドナー体内，またはバックテーブルでの保存前に挿入し，胆管機能による流動評価のために胆嚢は流入口を結紮し，胆汁生成，および胆管が押し出す圧力のみを計測した．

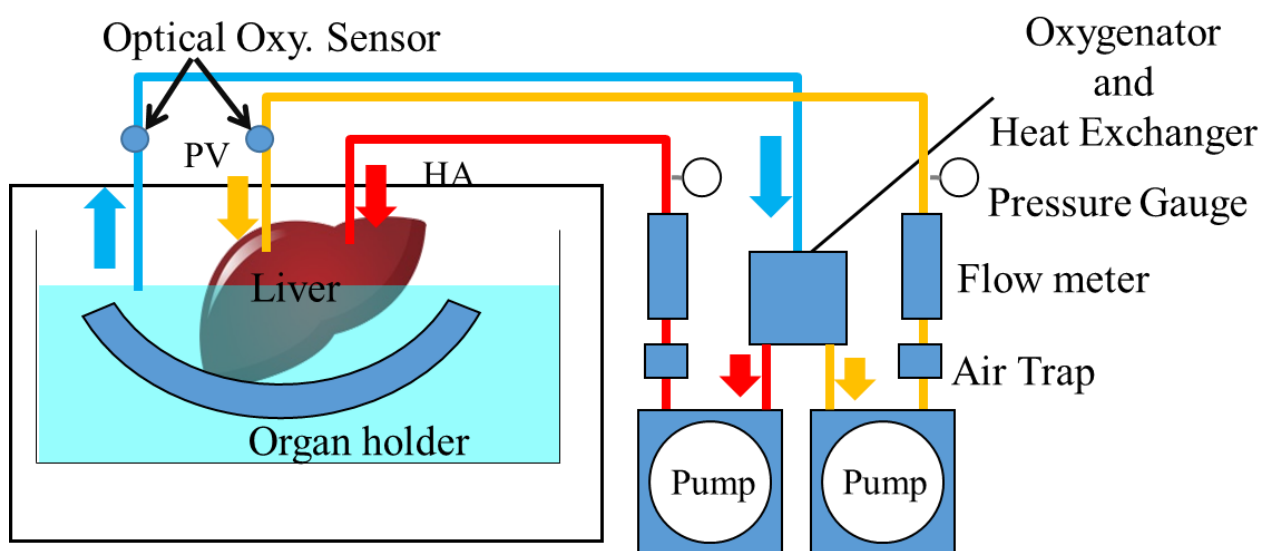


Fig. 3.1.1 Schematic diagram of liver perfusion system

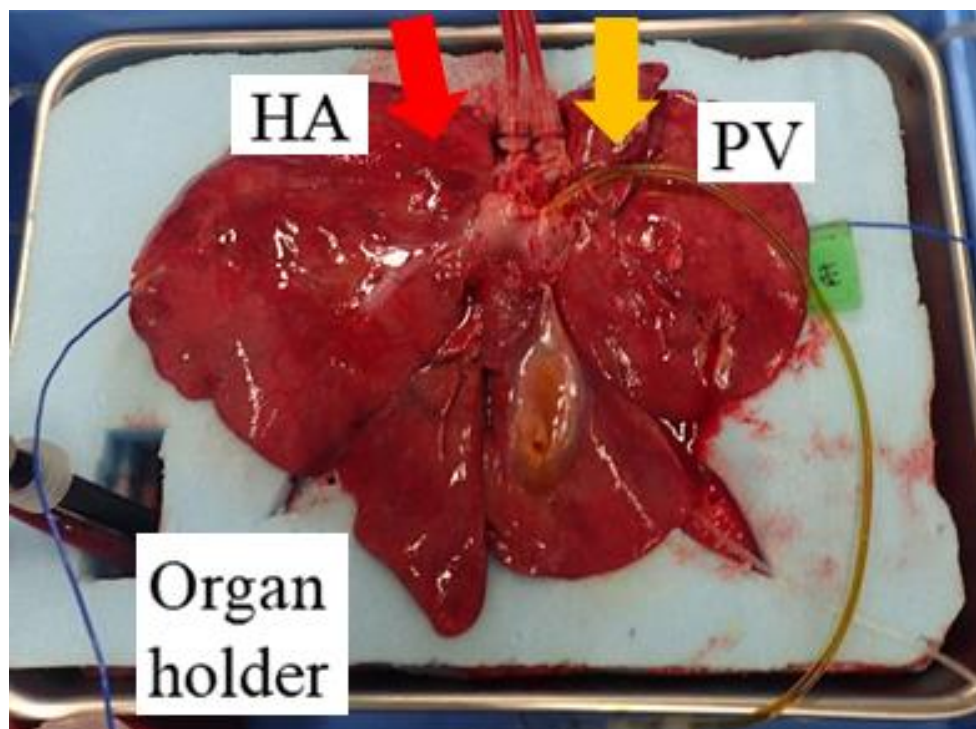


Fig. 3.1.2 The porcine liver on perfusion machine

3.2 心停止後肝臓への室温機械灌流法の有用性の評価

3.2.1 実験方法・手順

本実験では、心停止後肝臓への室温機械灌流法による臓器再生の有用性を検証するために、温阻血時間を 0, 30, 60 分の 3 種類の条件で肝臓を摘出し、障害肝を模擬した。使用した肝臓の重量は、保存前の時点で 773.3 ± 191.9 [g]であった。摘出後には、前述の通りバックテーブルにおいて、肝臓が有する 2 つの血管である門脈(PV)、肝動脈(HA)それぞれのカニューレーションを行い、速やかに低温のユーロコリンズ液、約 1L による脱血を行った後、4h の単純冷却保存法、あるいは室温機械灌法による保存を行った。実験群は、臨床的な基準となる①温阻血時間 0 分+単純冷却保存法(CS(WIT0))、対称群となる②温阻血時間 60 分+単純冷却保存法(CS(WIT60))、③温阻血時間 0 分+室温機械灌流法(SNMP(WIT0))、④温阻血時間 30 分+室温機械灌流法(SNMP(WIT30))、⑤温阻血時間 60 分+室温機械灌流法(SNMP(WIT60))の 5 群に分類し比較を行った(Fig3.2.1)。保存後には、後述する移植を模擬した 2h の体外血液再灌流モデル実験による、保存技術、また保存後の臓器機能の検証を行った。

単純冷却保存では氷上、あるいは冷蔵庫内で保存することで液温を 4-8°C に保ちながら、UW 液による浸透保存を行った。

室温機械灌流では、灌流流量を門脈 130[ml/min]、肝動脈 40[ml/min]の定流量による灌流を行い、保存温度は回路中の恒温機により液温を 22-23°C に調整することで管理を行った。また酸素供給量は肝臓上流側の酸素分圧を 300[mmHg]を目安として、下流側が枯渇しそうな場合に限り適宜調整を行った。

灌流液には、UW-gluconate 液を独自に調整したものを使用し、初期 pH は 1[mol/L]の NaOH による調整を行い、7.4[-]に調整して用いた。

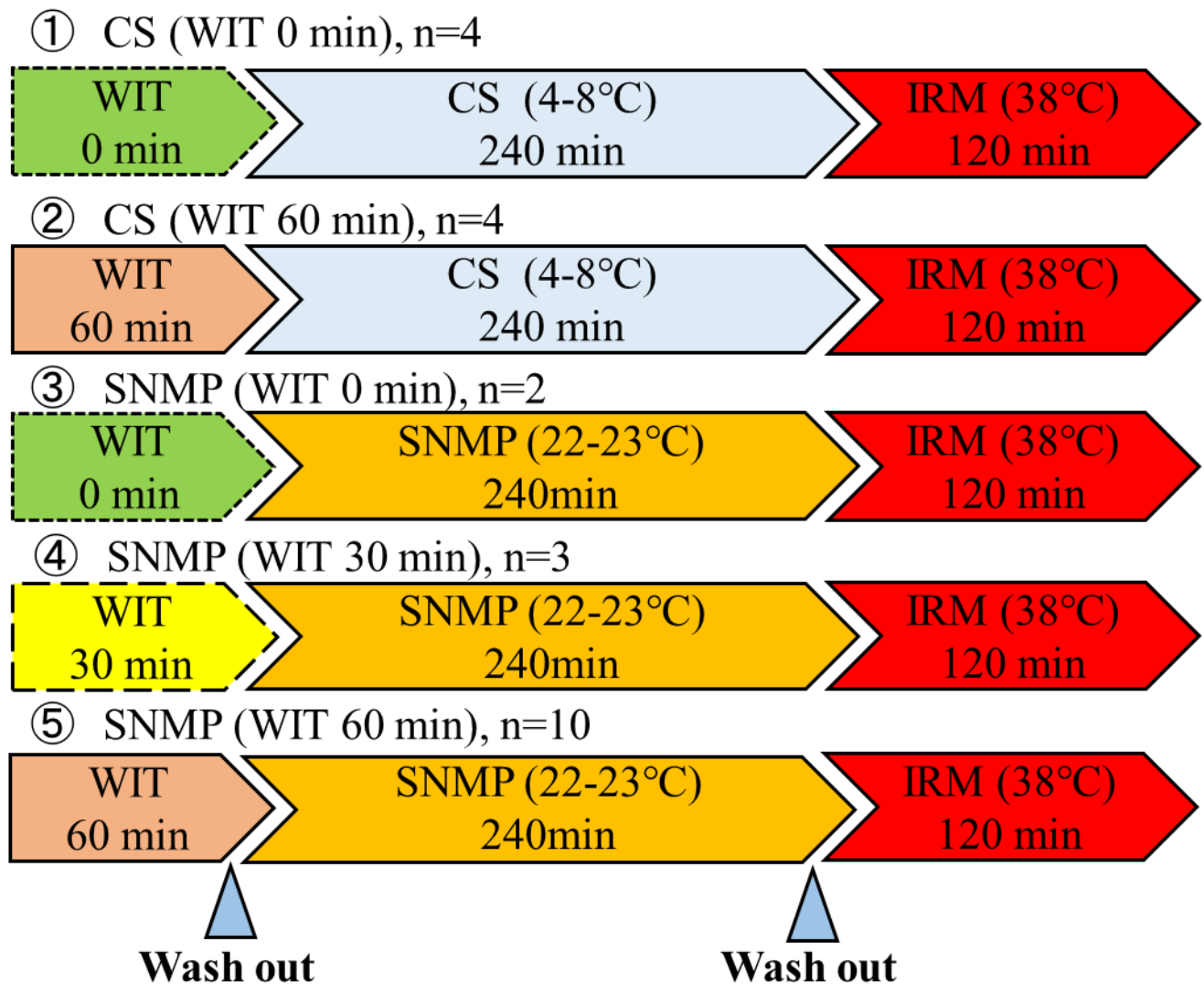


Fig.3.2.1 Experimental procedure on each preservation

3.2.2 ICG 蛍光観察

ICG(Indocyanine Green)は、前述のとおり血液や胆汁に含まれる血清蛋白質と結合することで蛍光特性を示す。特に肝臓においては、血液中に含まれるそのほとんどが肝実質細胞で取り込まれ、胆汁として胆管側に排出される特性を利用し、後述する体外血液再灌流モデルにおける、肝臓代謝機能の健全性の分布を可視化するマーカーとして使用した⁽⁵⁷⁾。

本実験では、体外血液再灌流モデル実験において、門脈回路から直接、0.12-0.25[mg/L]の濃度に希釈した ICG を投与した。投与量については、肝臓の重さや流れの偏りにも依存することから、蛍光状態を見ながらグラフト全体に広がるように徐々に投与した。励起光には 760nm の LED を用いて、高感度 CCD カメラ (Image EM X2 ; 浜松ホトニクス) でその蛍光を観察した。観察の際には、肝臓全体像が観察できるマクロレンズ (Nikon AF NIKKOR 24-50 1:3.3-4.5 ; ニコン)、および小葉単位で観察可能なズームレンズ (VH-Z100R; Keyence) の 2 種類のレンズを用い、自然光をカットする赤外光透過フィルター (IR-82 ; 富士フィルム) によって ICG による蛍光のみを観察した。

3.3 人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法

人工酸素運搬体 (HbV ; Hemoglobin Vehicle) は、人工赤血球とも呼ばれ、前述の通り血液型や感染源がない、高い酸素運搬機能を有する、室温で2年間保存ができるなどの利点から次世代医療に貢献するものとして高い期待を受けている。本来の目的である献血－輸血システムの課題解消のための、血液の代用はもちろん、近年では赤血球と比し非常に小さな粒径(人工酸素運搬体 ; 250nm, 赤血球 ; 8 μ m)を有し、血球が通過できない狭窄血管も通過することで、血管末梢までの酸素運搬が可能となる特性を利用した、臓器保存液や酸素治療薬への応用にも大きな注目を集めている⁽⁶¹⁾⁽⁶²⁾。

本実験では室温機械灌流法における、この人工酸素運搬体を従来の保存液に添加することによる有効性を検討した。実験は全ての実験群において温阻血時間 60 分で摘出した肝臓を用いて、摘出した臓器は 3.2 の実験同様に、速やかに脱血を行った。使用した肝臓の肝重量は、保存前で 815.9 ± 101.2 [g] であった。実験群としては①対照群の単純冷却保存群(CS)、②従来の UW 液 1500ml を用いた室温機械灌流群(SNMP (UW1500ml))、③灌流液の総量を 1500ml とし、人工酸素運搬体を 100ml 添加した低濃度の室温機械灌流群(SNMP (UW1400ml+HbV100ml))、④灌流液の総量を 1500ml とし人工酸素運搬体を 300ml 添加した中濃度の室温機械灌流群(SNMP (UW1200ml+HbV300ml))、⑤灌流液の総量 1000ml とし、人工酸素運搬体を 300ml 添加した高濃度の室温機械灌流群(SNMP(UW700ml+300ml))の 5 群に分類し、比較を行った(Fig.3.3.1)。人工赤血球は奈良県立医科大学で作製されたものを使用した。また、保存後には後述する体外血液再灌流モデルによる、保存後の臓器機能の検証を行った。

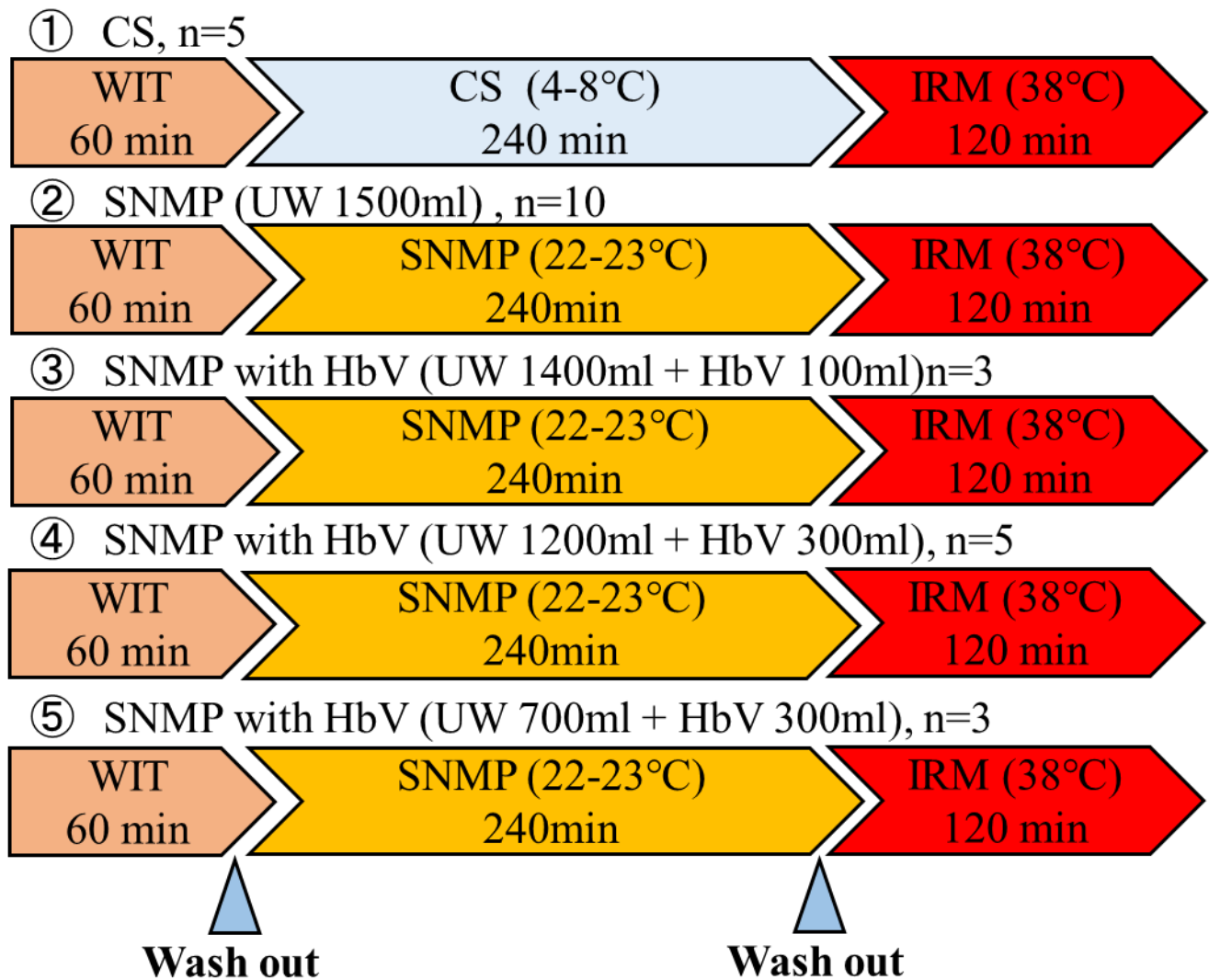


Fig.3.3.1 Experimental procedure on each preservation

3.4 分割肝移植への低温機械灌流法の適用

分割肝移植の分割法は、前述のとおり体内分割法と体外分割法に大別されるが、現在では多臓器摘出への影響を考慮して、一般的に体外分割法が選択される。一方で体外分割法は、ドナーの体内から摘出後に分割処理を行うことで、全肝と比して阻血時間の延長や温度管理の制限による障害を受けることに課題を有している。そこで本実験では、これらの課題を克服するべく、従来の方法と比し阻血時間の短縮、および術中の温度管理が可能となる、低温機械灌流法適用による、分割処理によるグラフトへの障害軽減の有用性を検討した。

実験は、全ての群において脳死臓器を想定して温阻血時間なしで摘出し、3.2の実験同様に、速やかに脱血を行った。使用した肝臓の肝重量は、保存前で 527.8 ± 270.2 [g]であった。実験群としては、①臨床的な基準となる全肝を4hの単純冷却保存群(Whole Liver with CS)、②対照群となる、バックテーブルで分割後、4hの低温機械灌流群、③バックテーブルで分割後、4hの低温機械灌流群(Split Liver with SBP)、④全肝の状態から低温機械灌流を行い、その初期に灌流しながら分割処理、総保存4hの低温機械灌流群(Split Liver with SDP)の4群に分類し、低温機械灌流法の分割肝グラフトへの有用性、および分割処理中の低温機械灌流法の有用性を検討した。低温機械灌流法は、実験3.2と同様に UW-gluconate を独自に調整したものをを用いて、下流側が枯渇しないように調整しながら酸素化を行った。その他の灌流条件は、3.2と同様とした。

分割処理は、小児への移植を想定して70%肝切除を行った。肝切離はモスキート鉗子を用い、クラッシュしながら残った脈管を結紮、切離した。左右glissonは一括で刺入結紮、あるいは2重結紮で処理した。下大静脈は尾状葉に囲まれており下大静脈は温存する形で分割肝を作製した⁽¹¹⁾(Fig.3.4.2, 3)。

また，保存後には後述する体外血液再灌流モデルによる，保存後の臓器機能の検証を行った．

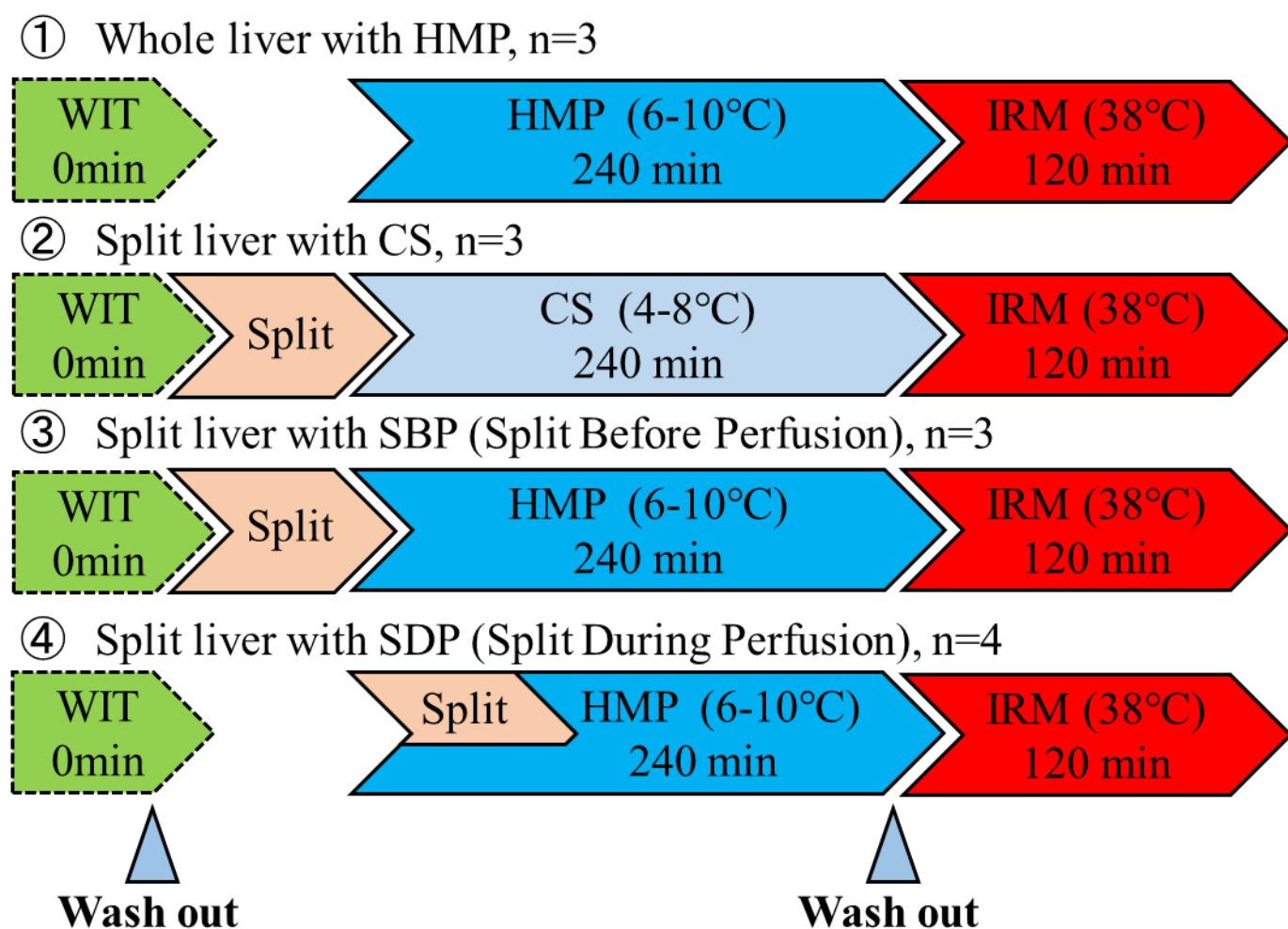


Fig.3.4.1 Experimental procedure on each preservation

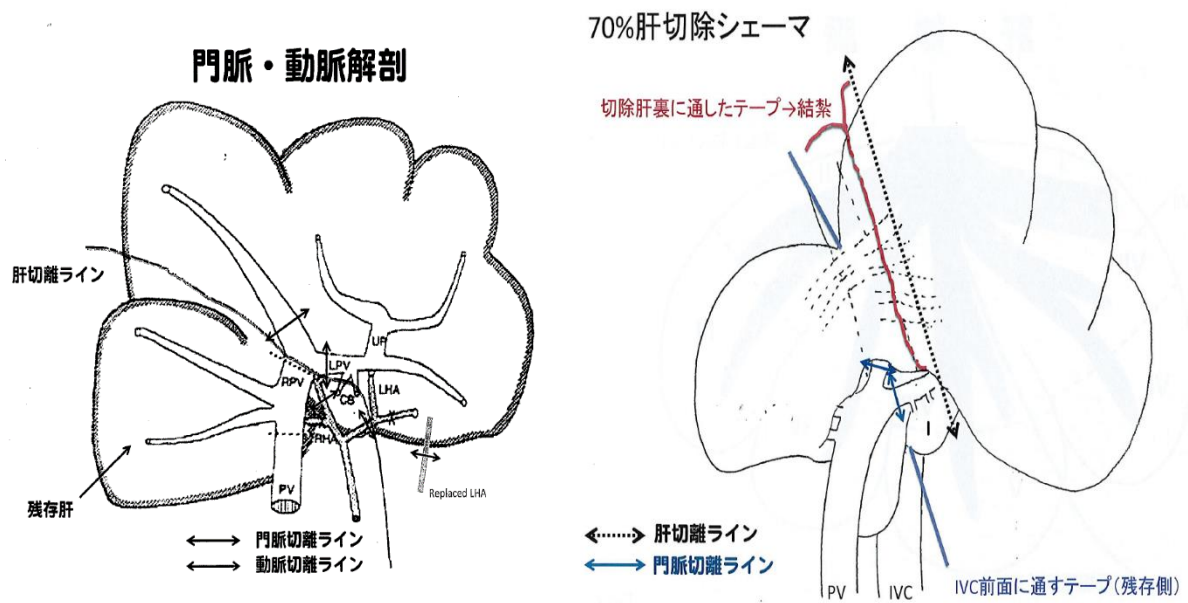


Fig.3.4.2 The process of split for liver graft

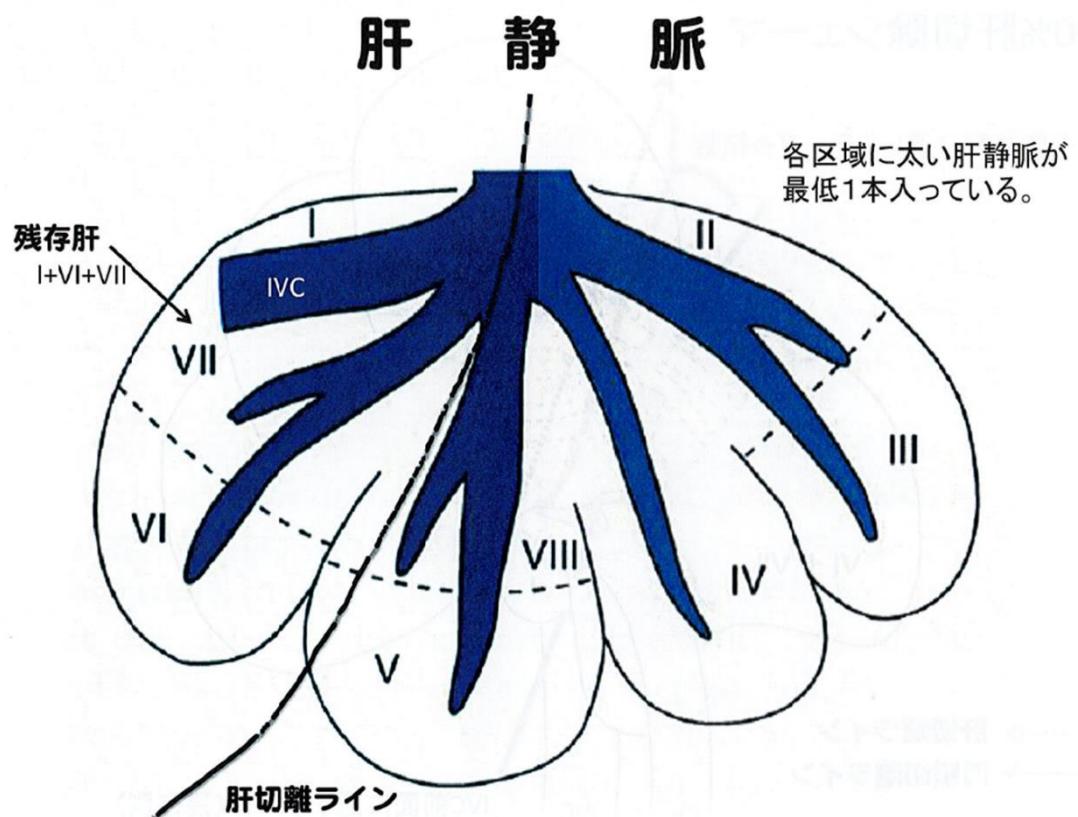


Fig.3.4.3 Residual area of split liver graft, is was made by 70% liver resection

3.5 体外血液再灌流モデルによる保存後の臓器機能の検証

3.5.1 実験方法・手順

灌流保存の効果を評価するにはレシピエントへ移植することが求められるが、実験上では手技や個体差、レシピエントの管理といった課題が多い。この課題を解決し、簡易に体外での灌流技術、保存後臓器機能の検証のために体温血液再灌流モデル（IRM, ex vivo Isolated reperfusion model）による実験を行なった。灌流保存後に血液を用いる恒温再灌流による検証は他の研究でも行われており、本実験での灌流条件や再灌流液などの条件はそれらを参考に、本実験装置に合わせ決定した⁽³⁹⁾⁽⁵²⁾⁽⁵³⁾⁽⁶³⁾⁽⁶⁴⁾。

本実験では移植を模擬して 4h の体外保存を経た肝臓を、保存時と同様の灌流装置を用いて、体温条件下(38℃)においてドナー血液を基本組成とする灌流液(Table.3.5.1)の再灌流を行うことで、その臓器機能を検証した。

特に、血流が遮断された臓器（心停止ドナー）は、血流が再開し再酸素化された際に虚血再灌流障害が起こる。この結果として、微小血管に血栓生成などが生じ、微小循環が障害され、各血管圧力の上昇や細胞障害による逸脱酵素排出量増加が誘起される。そのため、再灌流中の流動指標や液中成分、酸素消費量に注目することで、体外保存法の検証が可能となる。

本実験での灌流条件は灌流流量を門脈 210[ml/min]、肝動脈を 70[ml/min]を目安とした定流量による再灌流を行い、保存中と同様に極端に血管圧量が上昇する場合のみ適宜調整を行った。また再灌流液は上流の酸素分圧が 400[mmHg]を目安として酸素化を行い、肝臓下流側が枯渇しないように適宜調整を行った。本研究では、この検証モデルの有用性を評価するために、温阻血時間 0, 60 分で摘出した肝臓を、それぞれ 4h の単純冷却保存、低温機械灌流を実施し、再灌流による比較を行うことで実験モデルの検定を行った(Fig.3.5.1)。

Table 2.5.1 Composition of reperfusion solution

Components	Concentration [mL]
Autologous blood*	400
Saline*	500
Dextran	250
Calcicol	60
Sodium Bicarbonate	20
Heparin sodium	5
Potassium	10

*3.2 章の実験における SNMP(WIT0)の内一例，および SNMP(WIT30)の全三例において，ドナー血液 700ml，生理食塩水 200ml で再灌流液を作成（その他添加物については全実験で同様の条件とした）．

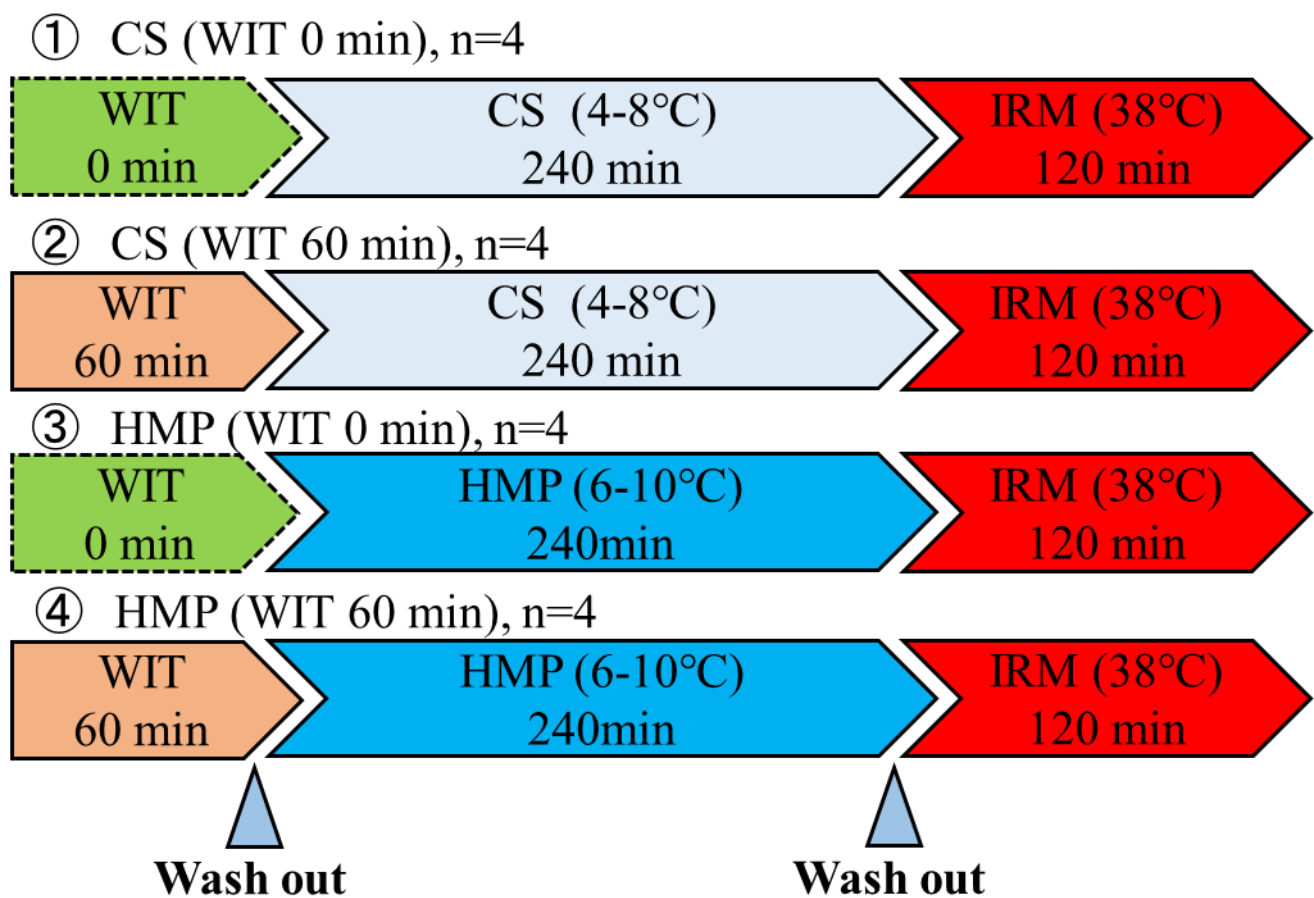


Fig.3.5. 1 Experimental procedure on each preservation

3.5.2 検定結果

体外血液再灌流モデルの検定結果を示す．今回は明らかに臓器機能に差が表れる温阻血時間 0, 60 分の肝臓を用いて、従来の保存技術である単純冷却保存、およびその有用性が報告されている低温機械灌流法による保存を行った臓器を比較した．使用した肝臓の肝重量は、保存前で 816.1 ± 119.6 [g]であった．

Fig.3.5.2, 3 は再灌流における門脈、肝動脈それぞれの灌流量を示したが、実験条件通り一定の灌流量で保存を行った．Fig.3.5.4-7 には、再灌流中の流動指標である門脈、肝動脈における血管圧力、血管抵抗を示した．これより、低温機械灌流群において、血管圧力は低値を維持し、良好な結果を示した．特に、肝動脈においては、門脈以上に極端な圧力差、また再灌流直後に急激な上昇(Fig.3.5.8, 9)を示した．これは、再酸素化による虚血再灌流障害に加え、門脈と比し非常に細管となる肝動脈では微小血栓の影響を強く受けたことが予想される．

Fig.3.5.10 には再灌流中の代謝指標となる酸素消費量を示した．これより、HMP(WIT60)群では、臨床的な基準となる CS(WIT0)群と統計学的に同程度の結果を示し、低温機械灌流法による心停止後肝臓の代謝機能の再生が示唆された．一方で HMP(WIT0)群では、再灌流初期には高値を示していたものの、時間とともに酸素消費量は低下したが、これは Fig.3.5.11 に示した通り、酸素供給量が不足していったことによるものである．この原因としては、生体と比し灌流量が少ないこと、血液と比しヘマトクリット値が 3 分の 1 程度で酸素運搬能が低下したことで、最も健全な代謝機能を持つその酸素需要に追いつけなかったことが考えられる．しかしながら、血管圧力を考慮するとこれ以上灌流量を上げることが困難であったことから、その後のいくつかの実験では、希釈倍率を変更し、ヘマトクリット値が 25%程度(全血で約 40%)になるように再灌流液を調整し、実験系の改良を行った．

Fig.3.5.12, 13 には再灌流中の肝機能指標である逸脱酵素 AST, LDH の蓄積量を示した。これより, CS(WIT60)群では明らかに高値を示した一方で, HMP(WIT60)群では温阻血時間なしで摘出した肝臓と統計学的に同程度の値を示し, 低温機械灌流法による肝機能の再生を示した。しかしながら, 再灌流液はブタ血液をベースとしていることから, 初期段階での大きな個体差が示された。そこで, Fig.3.5.14-19 には AST, LDH の各灌流時間ごとの逸脱酵素差分, つまりその時間の流出量を示した。これより, 再灌流 120 分間での流出量では統計学的な差を示し, 虚血再灌流障害による細胞障害が顕著な再灌流初期 30 分間でも, 各群の間では差が示された。Fig.3.5.20, 21 には血管内皮障害の指標であるヒアルロン酸(HA), および胆管障害の指標である ALP 蓄積量を示した。これらの指標に関しても, AST や LDH ほどの顕著な差ではないものの, 各群間での傾向が示され, 指標としての有用性を示唆した。Fig.3.5.22, 23 には血液ガス分析によって得られた乳酸レベル(Lactate), およびグルコースレベル(Glucose)を示した。特に, 乳酸レベルについては, 臨床的にも生体内の酸塩基平衡の重要な指標となるが, CS(WIT60)群において統計学的に有意に高値を示し, 肝機能障害や再酸素化による障害, つまり虚血再灌流障害によるアシドーシスの傾向が示された。またグルコースレベルについては, CS(WIT0)群が最も高値を示したが, HMP(WIT0)群については酸素供給量が低下したことで, 最終的な代謝を行うための酸素が不足し, その結果グルコース生成量が低下したと予想される。

前述のとおり, 心停止後肝臓に対する低温機械灌流法の有用性は多数報告されている。本検証モデルにおいても, 各種流動指標や肝機能指標により, その有用性が示され, 加えて温阻血時間の有無による臓器機能への影響も示唆した。以上の結果から, 体外血液再灌流モデルによる保存後の臓器機能, すなわち保存技術の検証が可能であることが明らかとなった。

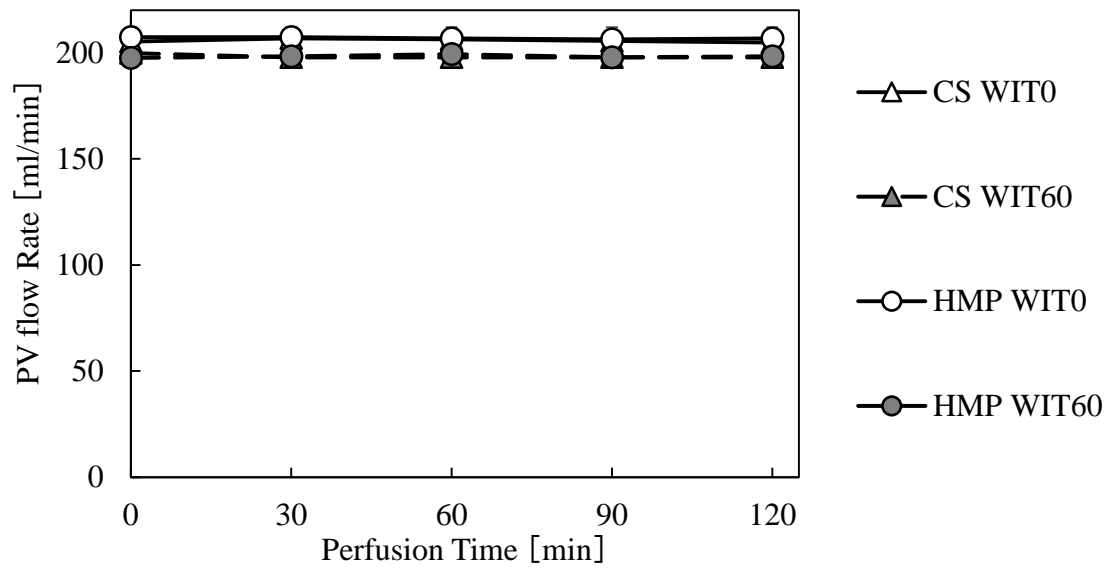


Fig.3.5.2 Flow rate of portal vein after reperfusion

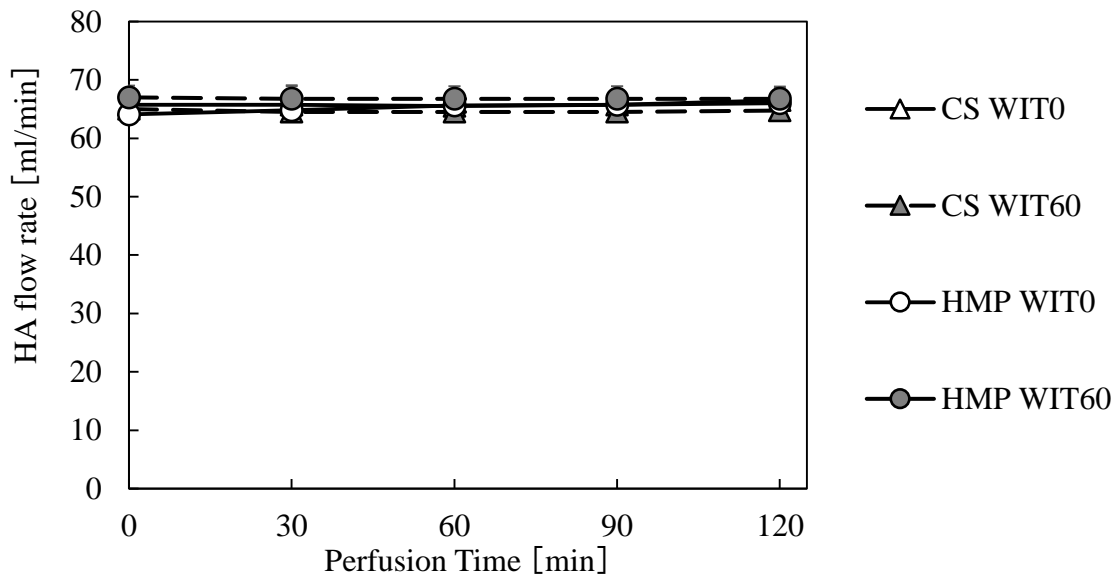


Fig.3.5.3 Flow rate of hepatic artery after reperfusion

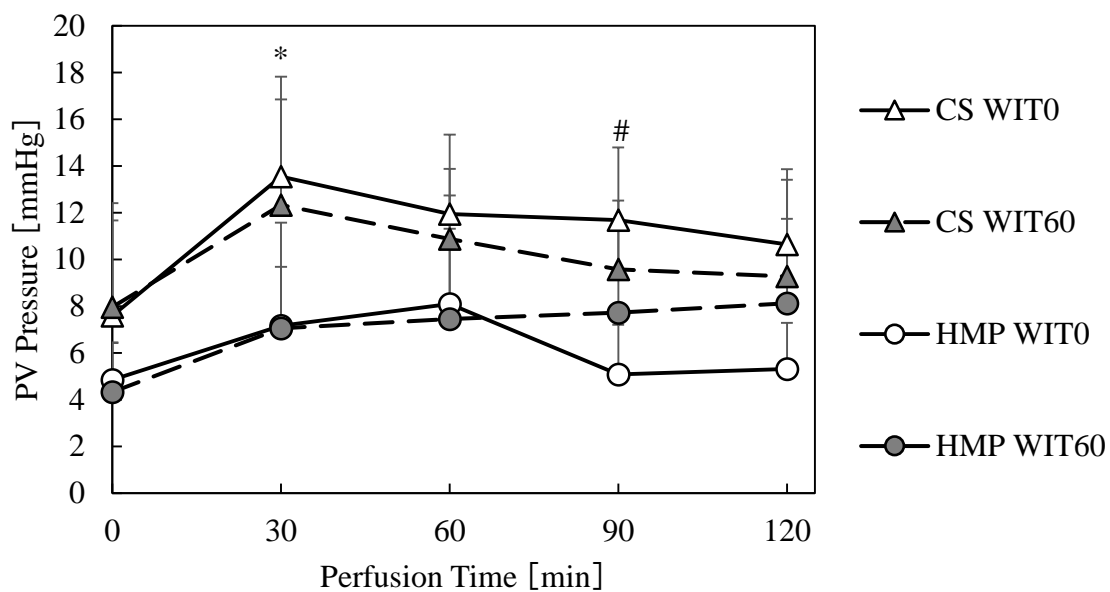


Fig.3.5.4 Portal vein pressure after reperfusion

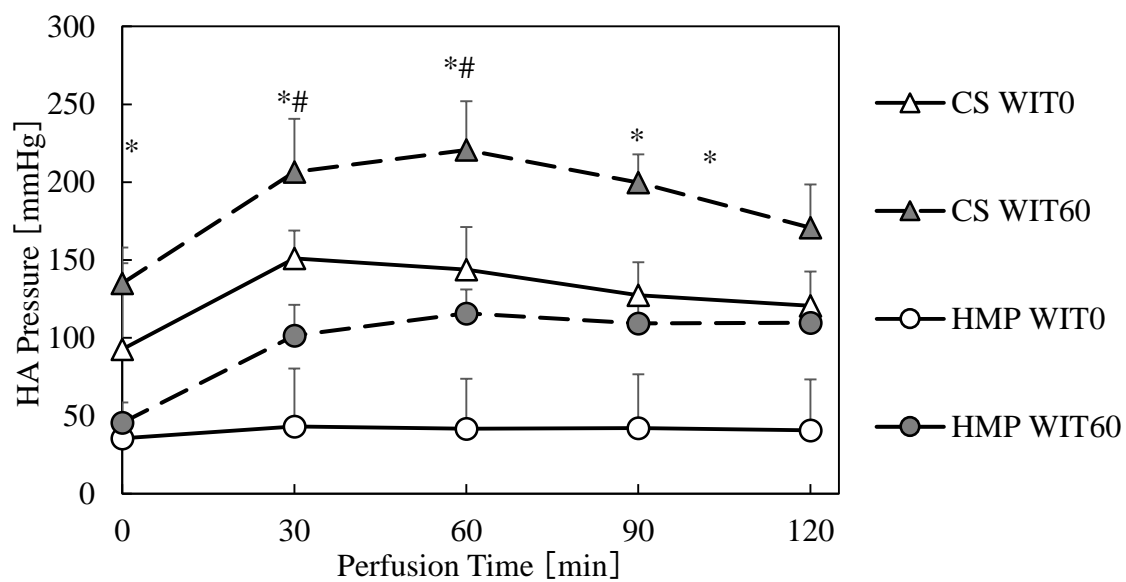


Fig.3.5.5 Hepatic artery pressure after reperfusion

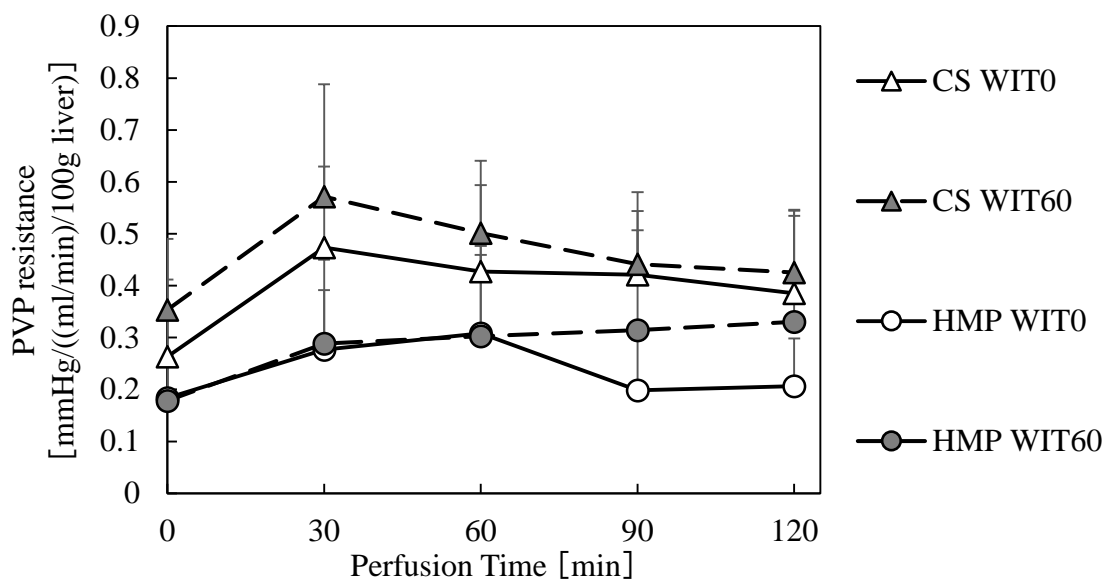


Fig.3.5.6 Portal vein resistance after reperfusion

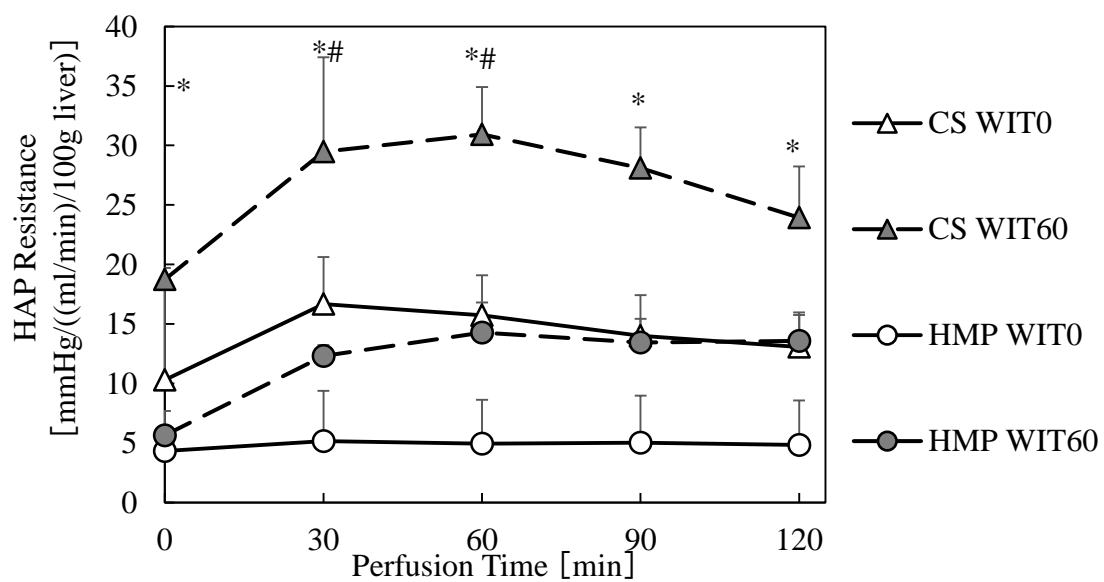


Fig.3.5.7 Hepatic artery resistance after reperfusion

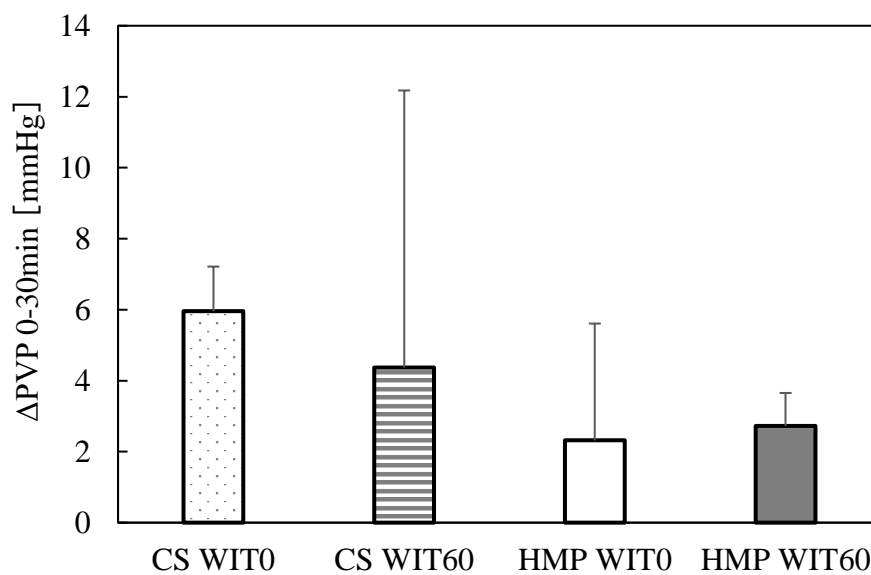


Fig.3.5.8 The change amount of PV pressure after reperfusion (0-30min)

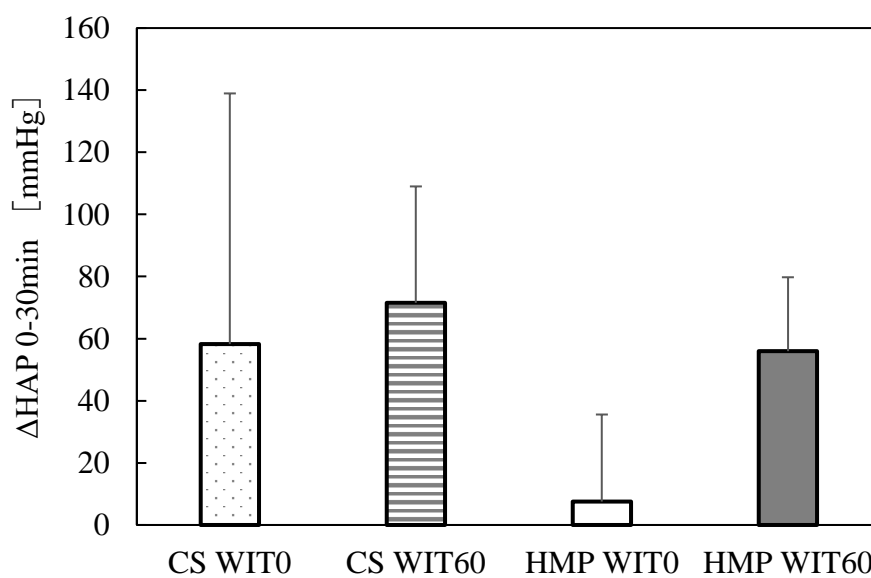


Fig.3.5.9 The change amount of HA pressure after reperfusion (0-30min)

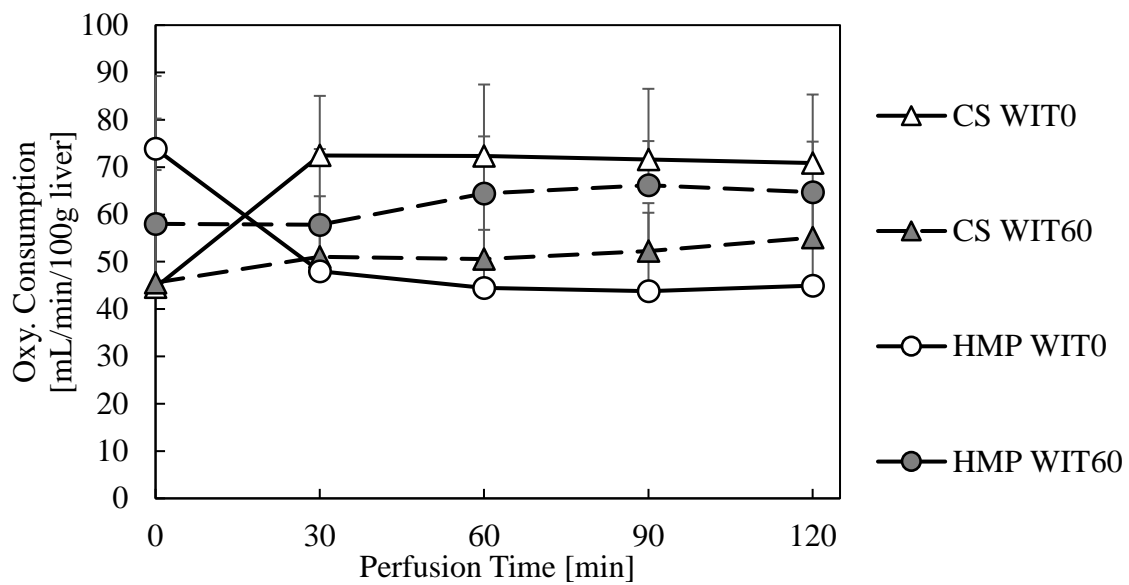


Fig.3.5.10 Oxygen consumption after reperfusion

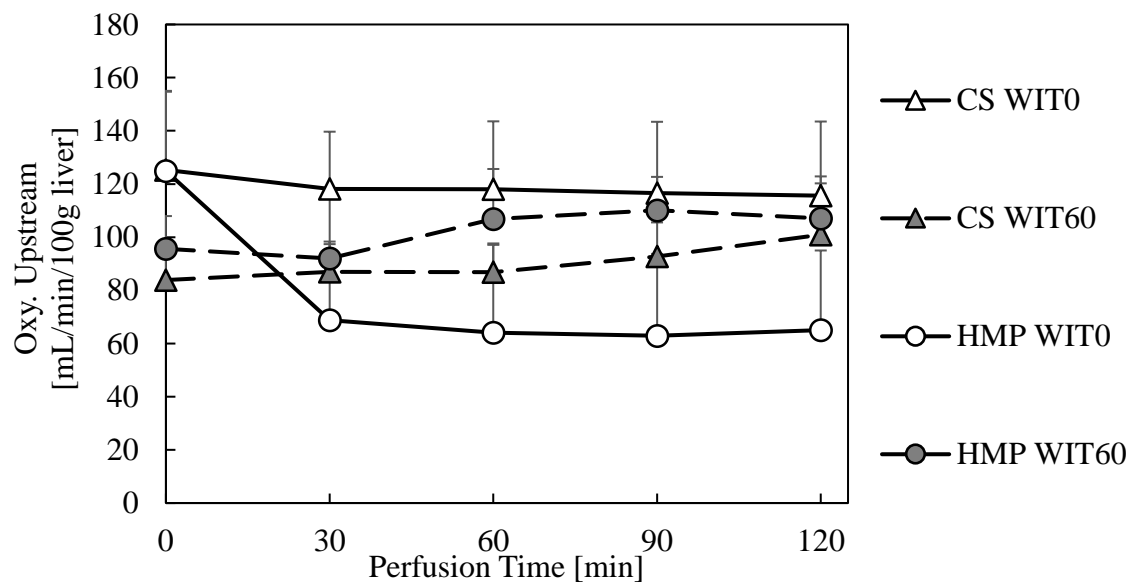


Fig.3.5.11 The amount of oxygen supply after reperfusion

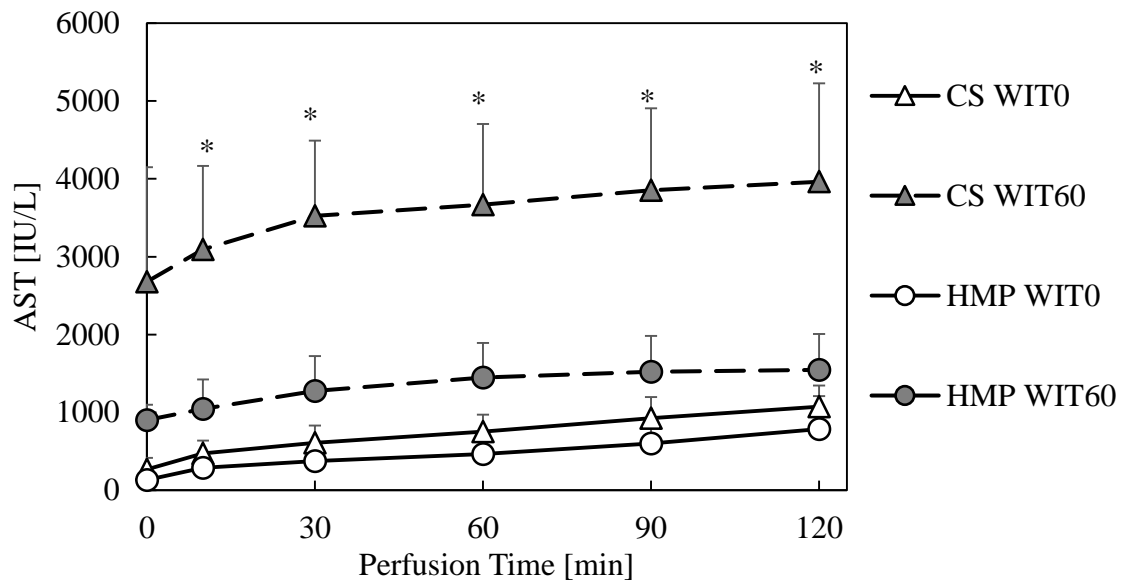


Fig.3.5.12 The amount of AST after reperfusion

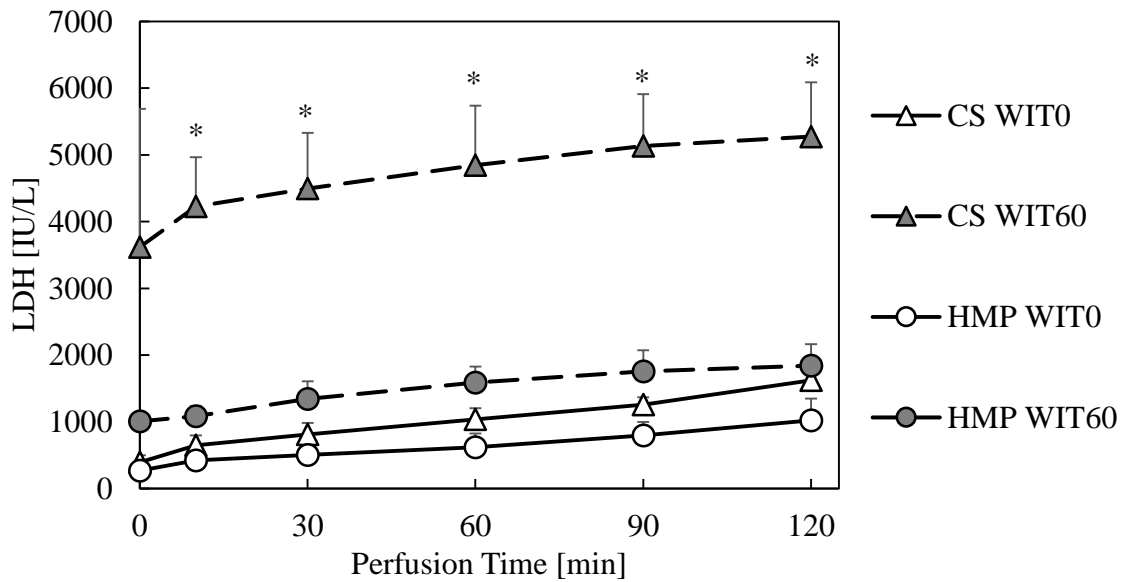


Fig.3.5.13 The amount of LDH after reperfusion

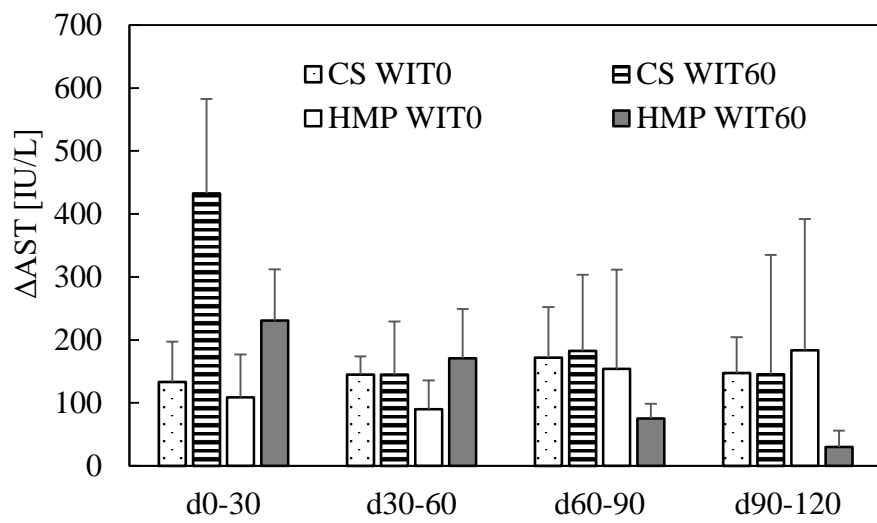


Fig.3.5.14 The release of AST after reperfusion each 30min

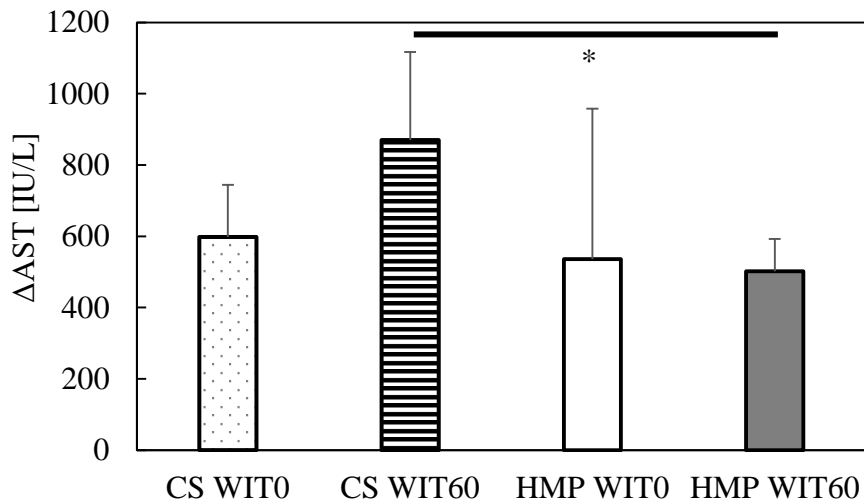


Fig.3.5.15 The release of AST after reperfusion (0-120min)

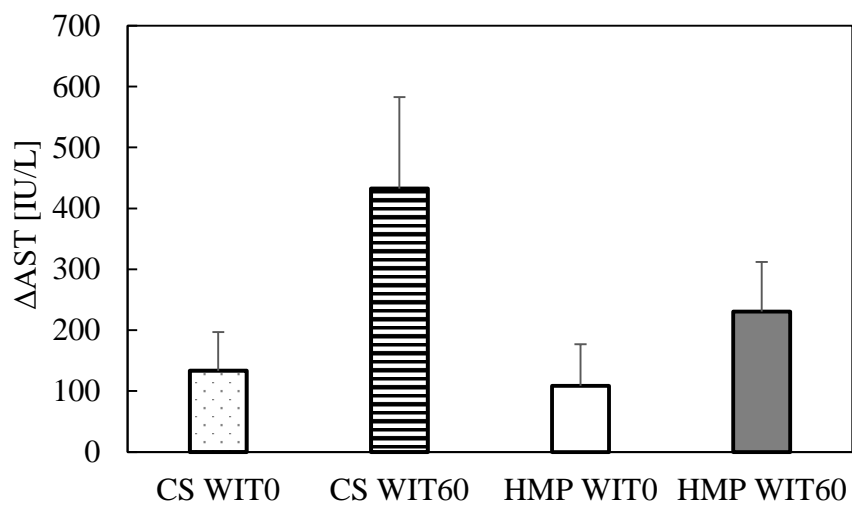


Fig.3.5.16 The release of AST after reperfusion (0-30min)

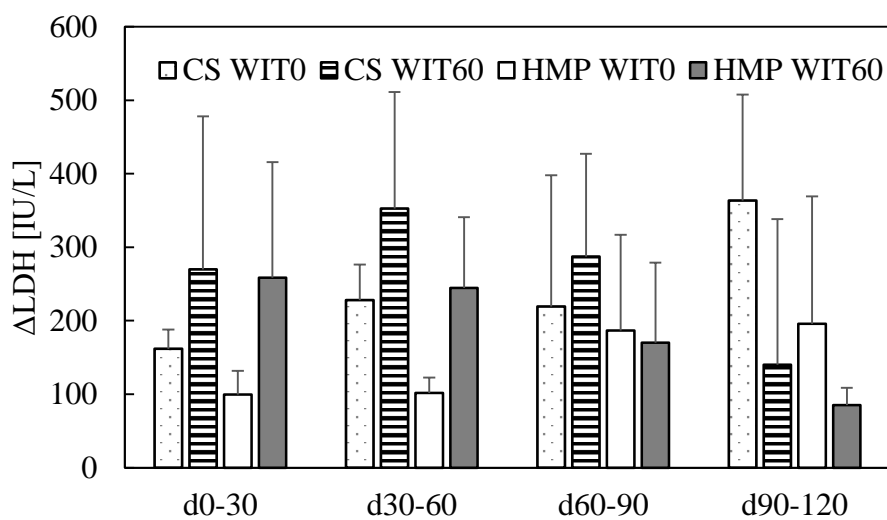


Fig.3.5.17 The release of LDH after reperfusion each 30min

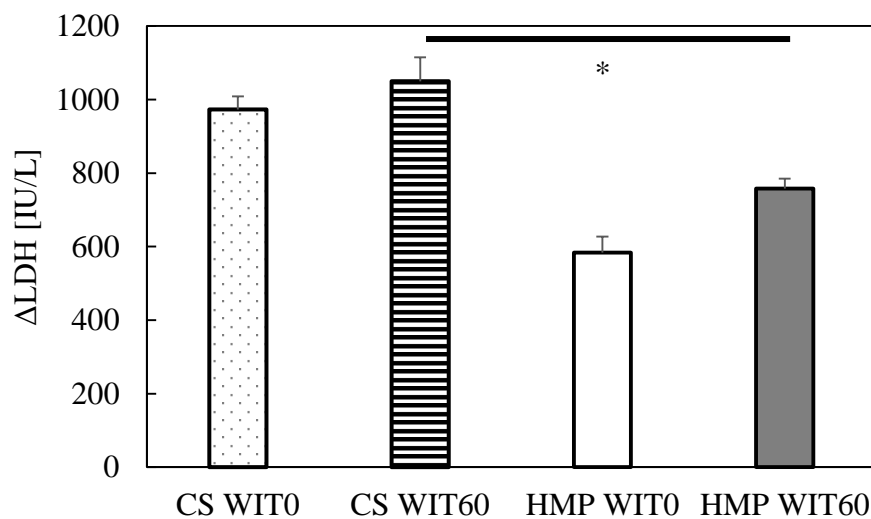


Fig.3.5.18 The release of LDH after reperfusion (0-120min)

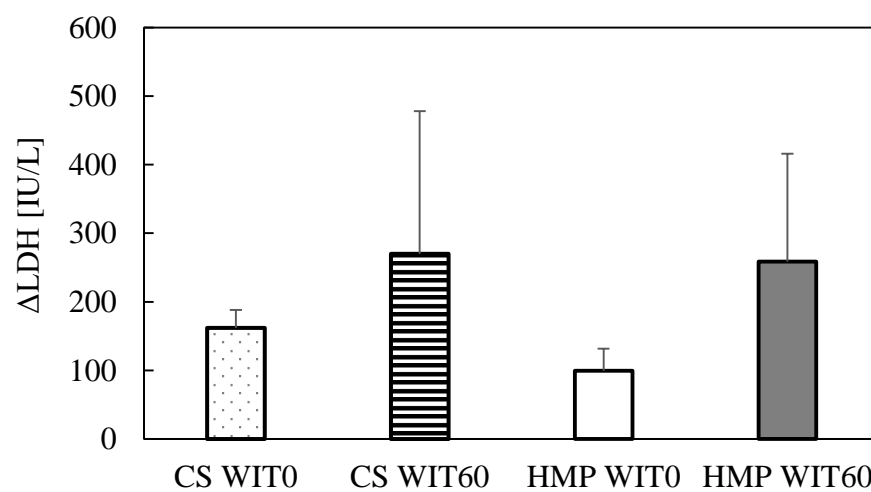


Fig.3.5.19 The release of LDH after reperfusion (0-30min)

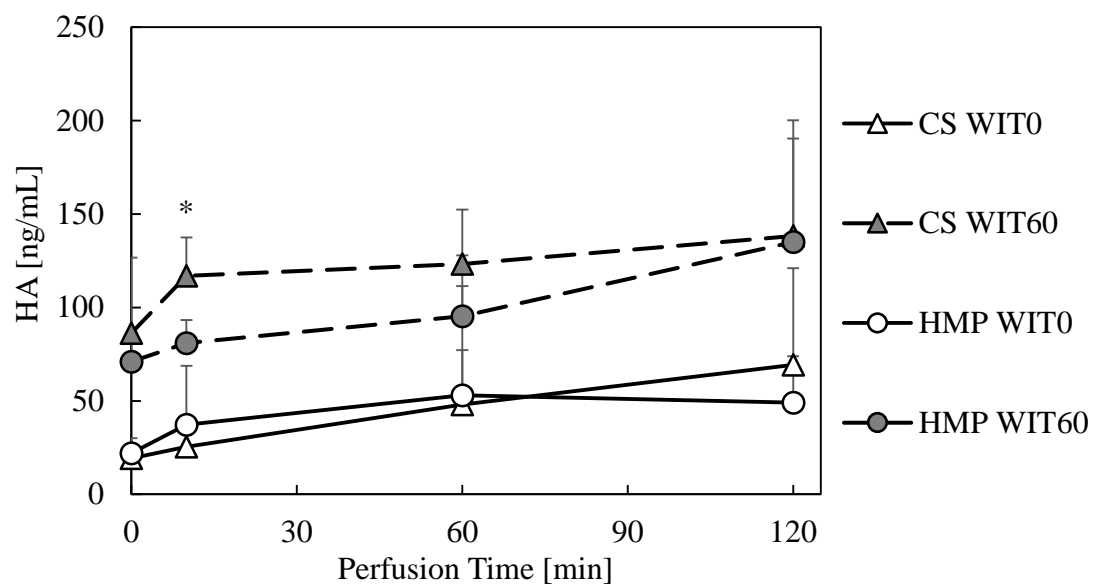


Fig.3.5.20 The amount of HA after reperfusion

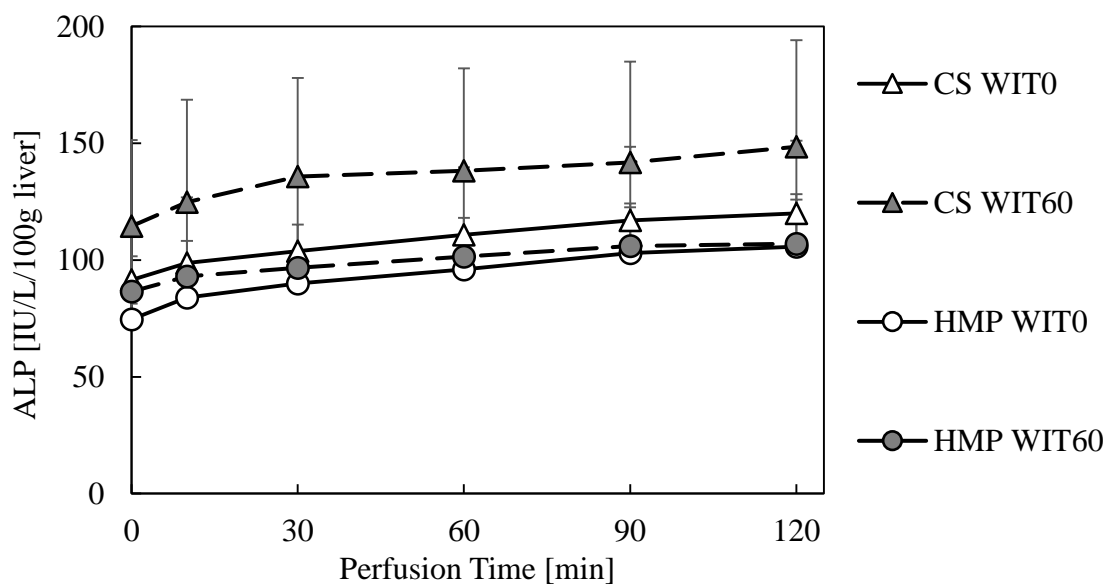


Fig.3.5.21 The amount of ALP after reperfusion

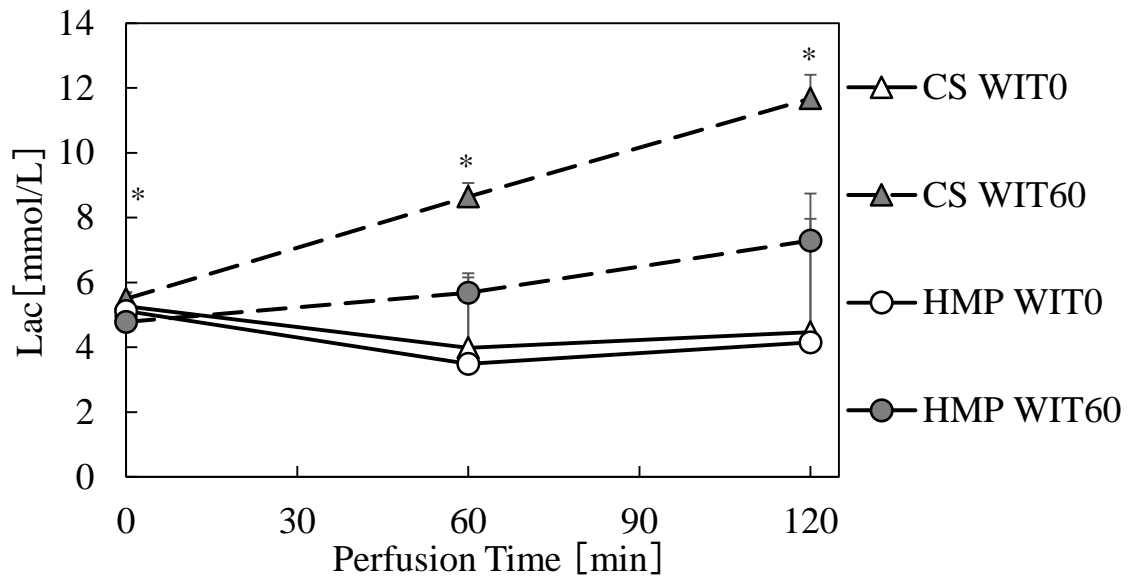


Fig.3.5.22 Lactate level after reperfusion

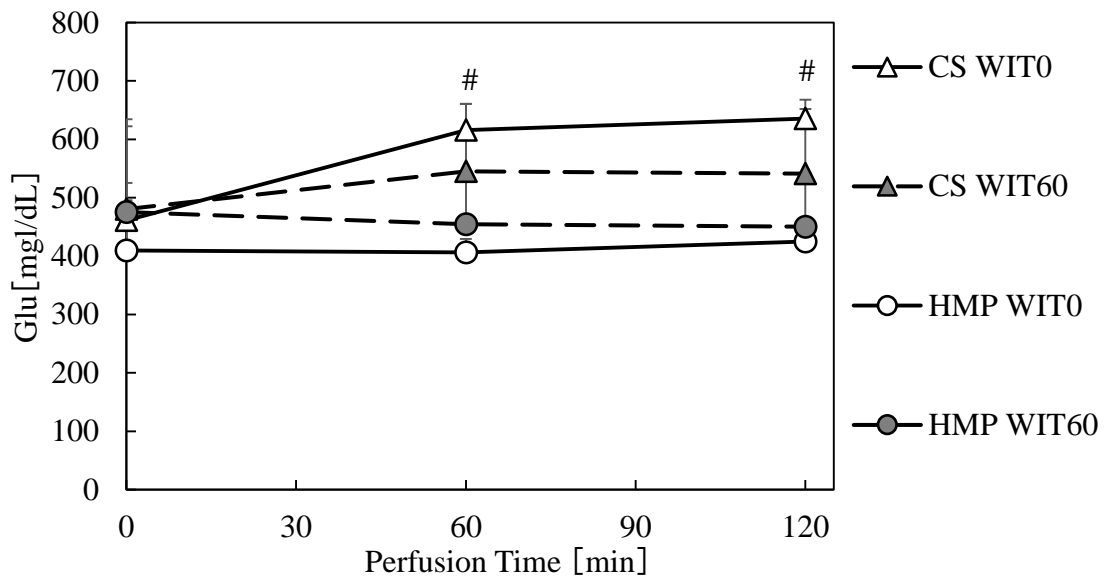


Fig.3.5.23 Glucose level after reperfusion

四章 実験結果

4.1 心停止後肝臓への室温機械灌流法の有用性の評価

4.1.1 室温灌流中の流動指標

4 時間の室温機械灌流中に得られた灌流量，血管圧力，血管抵抗の流動指標を示す．Fig.4.1.1, 2 には各実験群における，門脈，肝動脈それぞれの灌流流量を示した．これより，基本的には灌流流量は一定の条件で実験を行ったが，一部条件における肝動脈については血管圧力と対応して，若干の調整を行った．

Fig.4.1.3, 4 には各条件における門脈，肝動脈圧力を示し，Fig.4.1.5, 6 には血管圧力を灌流量と単位当たりの肝重量で除した，普遍的な流動指標である血管抵抗を示した．これより，門脈における血管圧力，血管抵抗では温阻血時間を経て障害を受けたことが想定される条件である，SNMP(WIT30), SNMP(WIT60) 群においても，灌流 4 時間を通じて安定した値を示し，各群間での統計学的な差は示されなかった．ただし，SNMP(WIT30)群においては，灌流 3 時間ごろから一時的な圧力の上昇を示したが，これは後述する ICG 投与による一時的な流動の障害が予測される．また肝動脈については，温阻血時間 60 分の条件については灌流開始直後，血管圧力，および血管抵抗は高値を示したが，その後は時間の経過とともに低下の傾向を示した．肝動脈は，門脈と比し管径が小さく，微小血栓や血管収縮による流量調整能の低下に影響を受けやすいことから，温阻血時間を経て障害を有したことでその傾向が顕著に示されたと考えられる．一方で室温機械灌流の時間の経過とともに，血管圧力，抵抗は低下傾向を示し，最終的には SNMP(WIT30)群では SNMP(WIT0)群，つまり温阻血時間なしで健全な臓器機能を有する実験群と同程度の値を示し，極めて厳しい条件から始まる SNMP(WIT60)群においても回復傾向を示したことから，室温機械灌流法による流動機能の改善が示唆された．

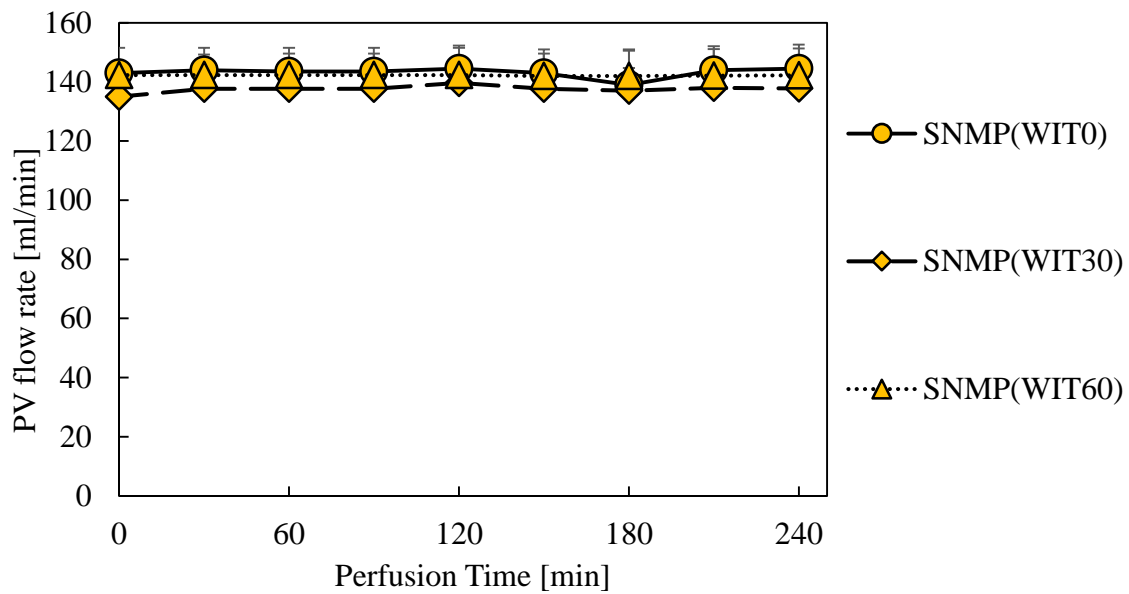


Fig.4.1.1 Flow rate of PV during SNMP

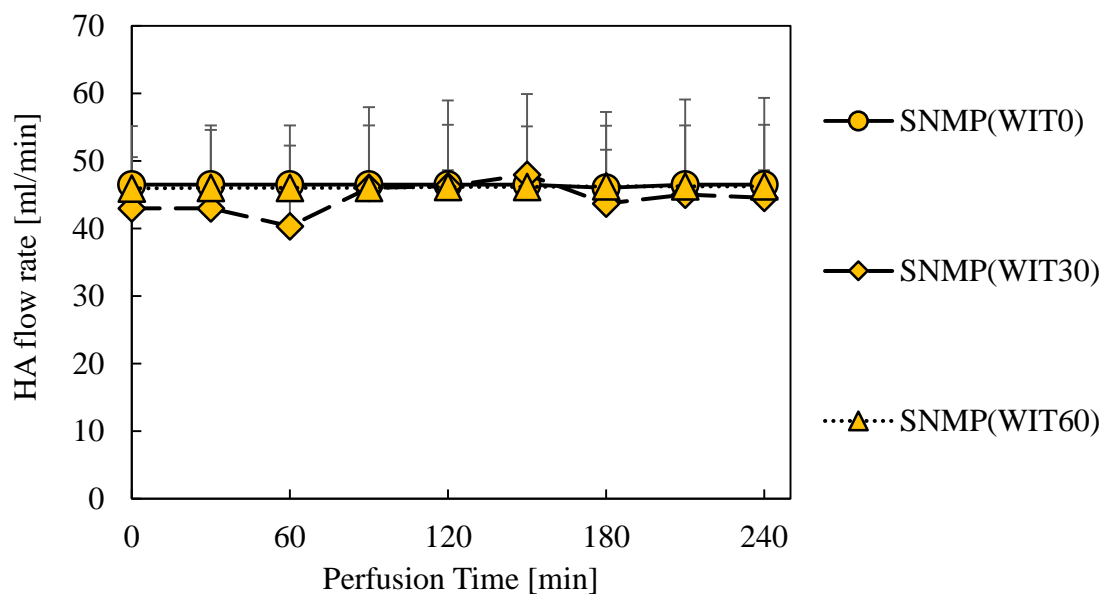


Fig.4.1.2 Flow rate of HA during SNMP

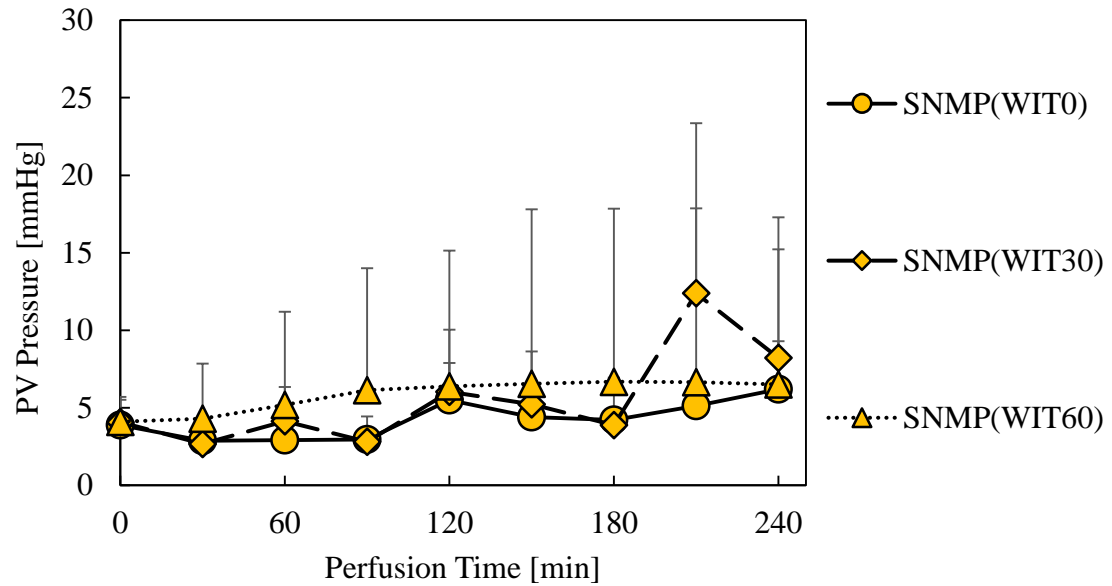


Fig.4.1.3 PV Pressure during SNMP

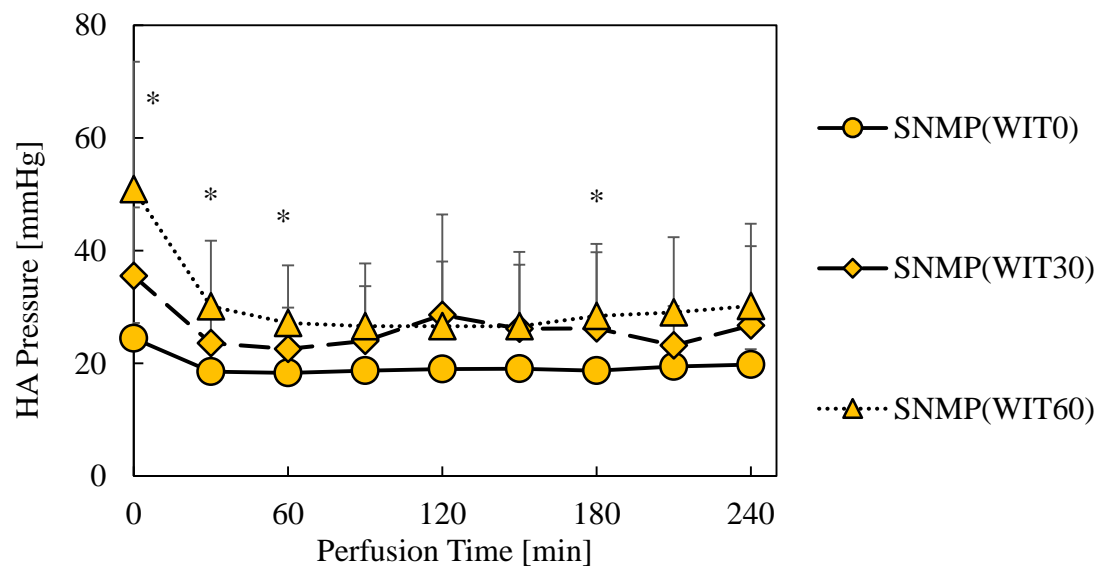


Fig.4.1.4 HA Pressure during SNMP

*SNMP(WIT0) vs. SNMP(WIT60), #SNMP(WIT30) vs. SNMP(WIT60); $p < 0.05$

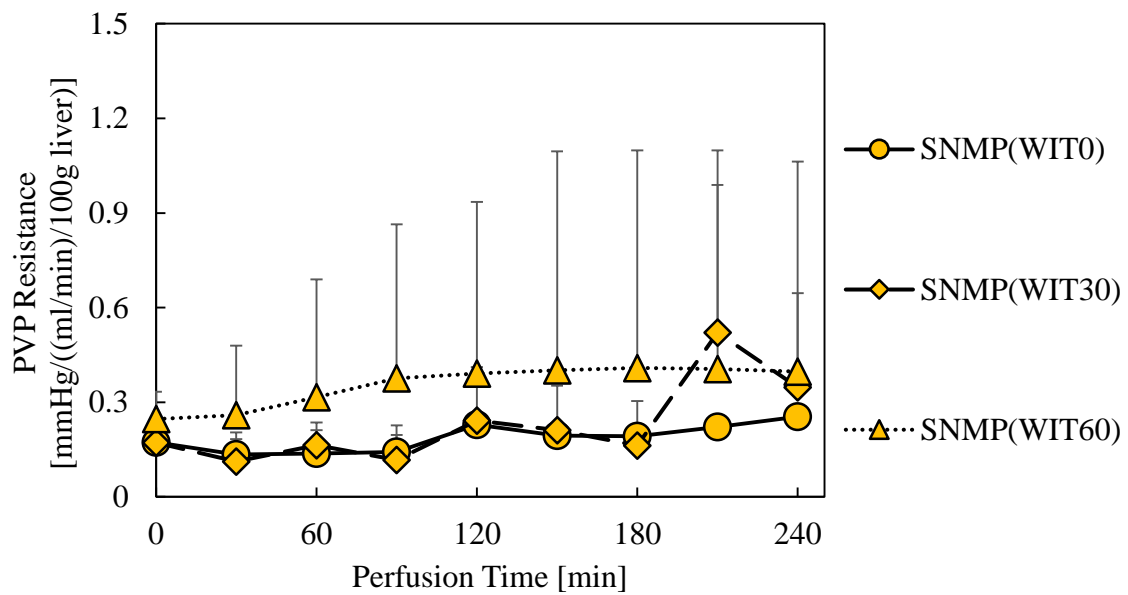


Fig.4.1.5 PVP Resistance during SNMP

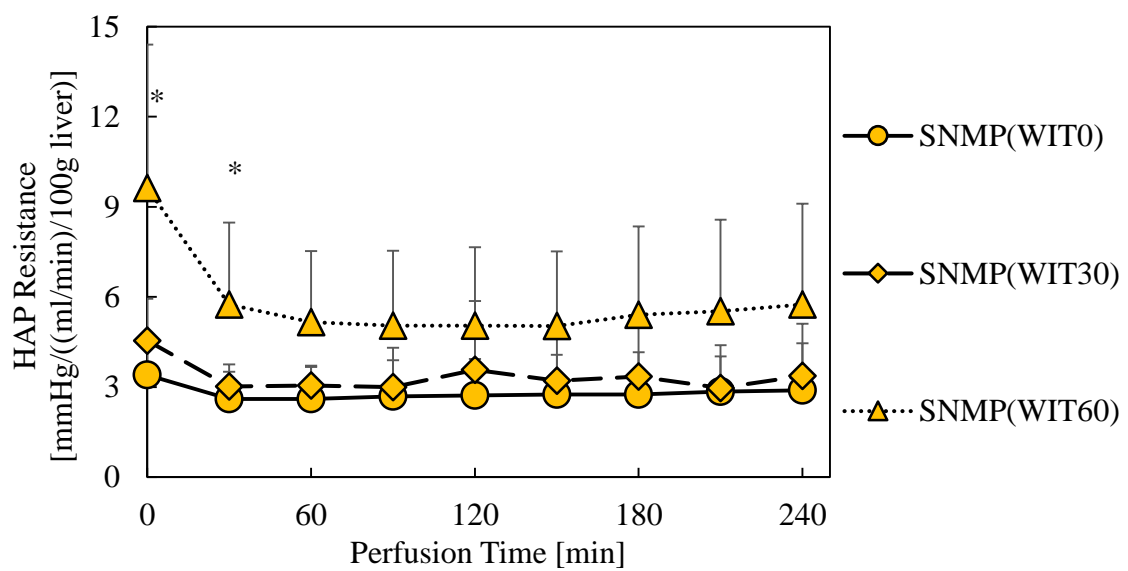


Fig.4.1.6 HAP Resistance during SNMP

*SNMP(WIT0) vs. SNMP(WIT60), #SNMP(WIT30) vs. SNMP(WIT60); $p < 0.05$

4.1.2 室温灌流中の肝機能指標

4 時間の室温機械灌流中に得られた肝機能指標である逸脱酵素 AST, LDH の結果を示す. Fig.4.1.7 には灌流中の逸脱酵素 AST, Fig.4.1.8 には逸脱酵素 LDH の肝臓下流側における灌流液への蓄積量を示した. 前述のとおり, 逸脱酵素は細胞が破壊されることで流出されることから, その流出量, つまり灌流液中の蓄積量が高値であるほど, 重度な肝機能障害を有していることが予想される. そのため, 特に灌流初期において温阻血時間が長い条件, つまり重度な温阻血障害を受けた実験群ほど逸脱酵素蓄積量は増加し, その肝機能障害の程度を示した. また Fig.4.1.9,11 には逸脱酵素 AST, LDH の室温機械灌流 4 時間での総流出量, Fig.4.1.10, 12 には灌流 30 分毎の流出量を示した. 温阻血時間を与えられた臓器は細胞障害が進行し, 再酸素化の際には虚血再灌流障害が生じる. これは時間ごとの逸脱酵素流出量からわかるように, 温阻血時間を与えられた臓器は特に, 灌流初期において多量の逸脱酵素が流出されることから, 明らかである. 一方でその後はたとえ温阻血時間を経た条件群であっても, 逸脱酵素流出量が少なくなっていることから, 室温機械灌流法によって細胞障害の進行は抑制され, 臓器機能の改善が行われていることが示唆された.

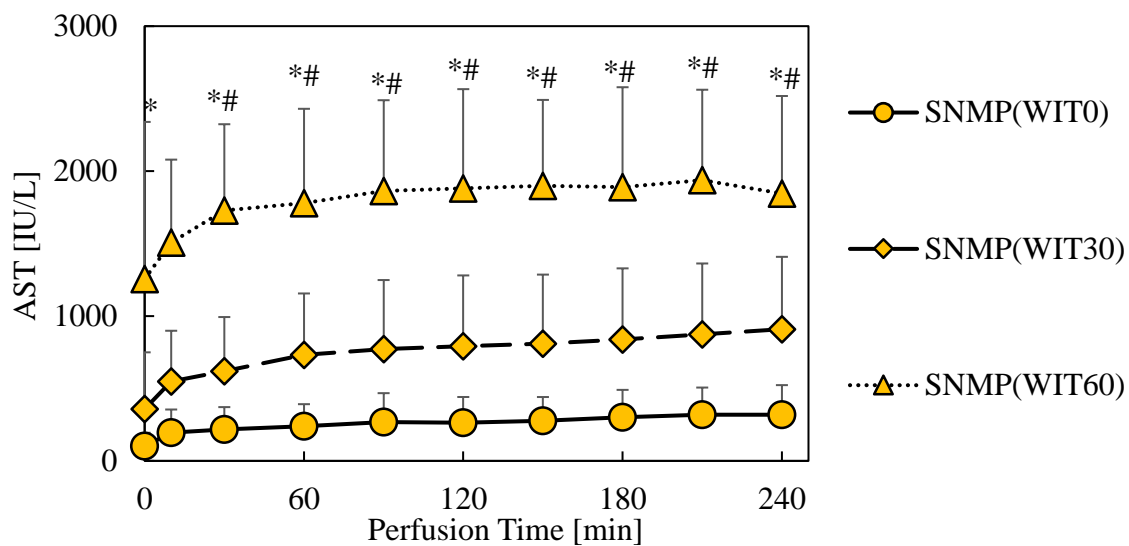


Fig.4.1.7 The amount of AST during SNMP

*SNMP(WIT0) vs. SNMP(WIT30), #SNMP(WIT30) vs. SNMP(WIT60);
 $p < 0.05$

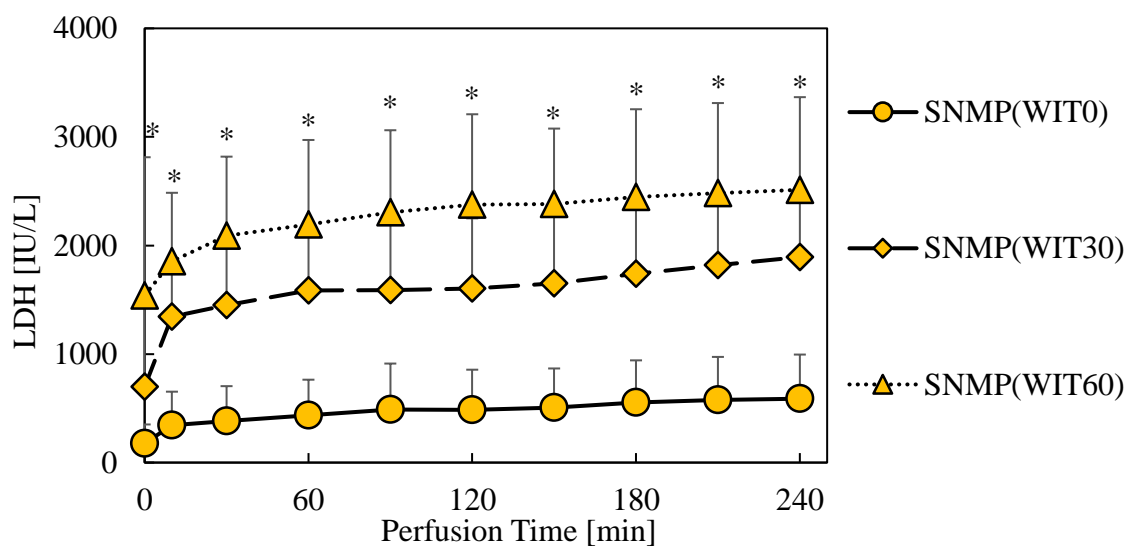


Fig.4.1.8 The amount of LDH during SNMP

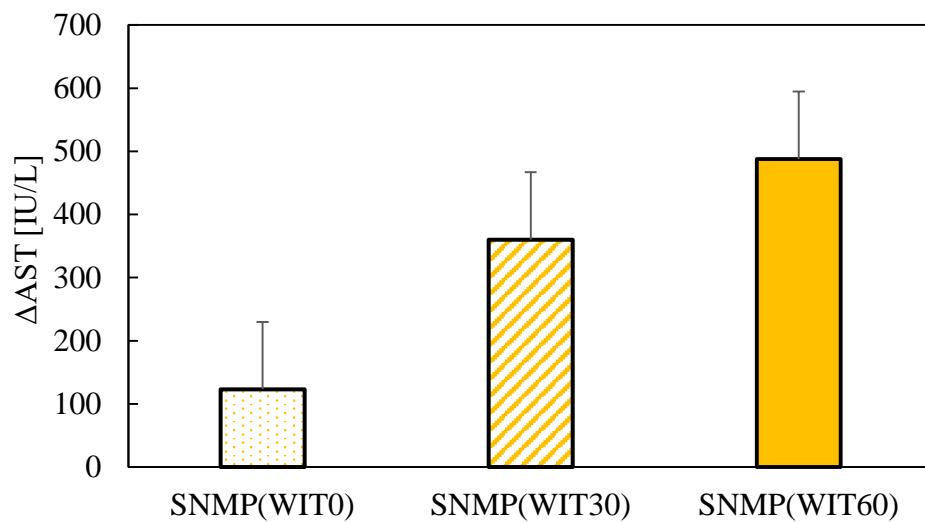


Fig.4.1.9 The release of AST during SNMP in 240 min

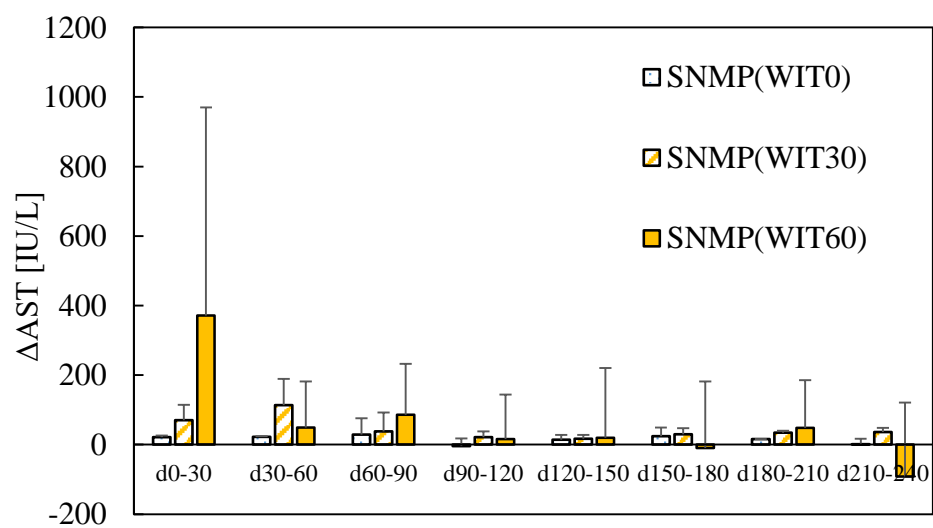


Fig.4.1.10 The release of AST during SNMP each 30min

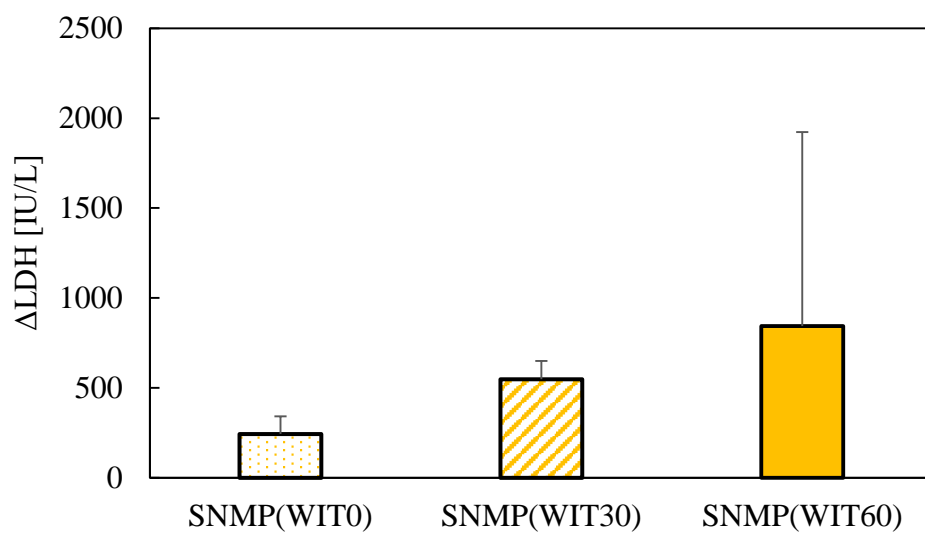


Fig.4.1.11 The release of LDH during SNMP in 240 min

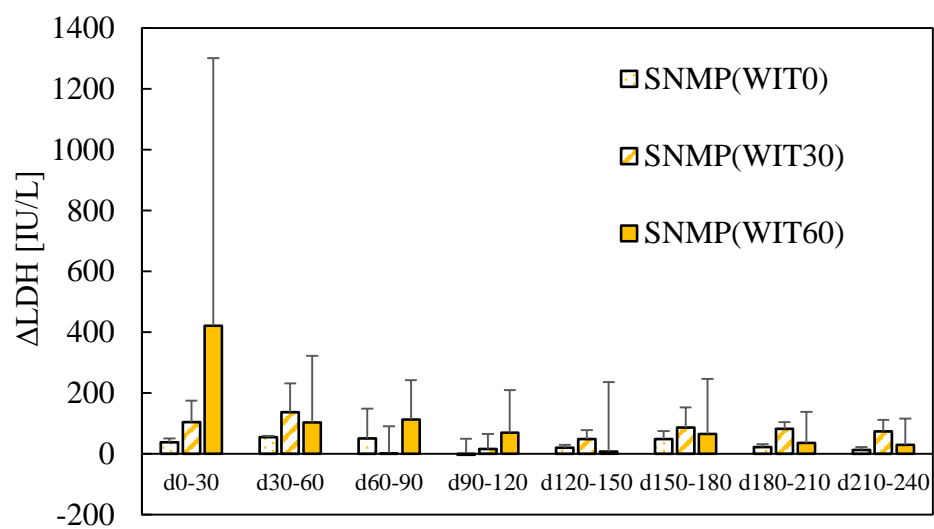


Fig.4.1.12 The release of LDH during SNMP each 30min

4.1.3 室温灌流中の代謝因子

室温機械灌流における酸素消費量や灌流液中の pH, またそれに伴う各種代謝因子を示す. Fig.4.1.13-16 には, 灌流中の肝臓酸素消費量を示した. 前述のとおり, 酸素消費量はエネルギー代謝の最終過程における重要な要素であり, 積極的な臓器再生のための代謝活性の指標として重要であると考えられる. ここでは3種類の温阻血時間(0, 30, 60 分)の条件群について示しているが, 統計学的な差はなかった. しかしながら, SNMP(WIT30)群において酸素消費量はやや高値を示し, 一方で本来最も健全な臓器であるはずの SNMP(WIT0)では, かなり厳しい条件である SNMP(WIT60)群と同程度の酸素消費量を示した.

Fig.4.1.16-18 には灌流中の保存液中 pH を示した. 保存液の初期 pH は実験条件で記したように, 生体内での基準である 7.4 に調整して用いたが, SNMP(WIT30), SNMP(WIT60)群の, 温阻血時間を経て摘出した肝臓では灌流開始直後から急激な pH の低下, つまりアシドーシスの傾向を示した. 温阻血時間を経た肝臓は血流停止, 虚血による栄養・酸素の欠乏状態となり, 肝細胞や胆管機能を始めとしたその機能は深刻な障害を受けることになる. そのため, 灌流開始直後には細胞膜の破壊により多量の H^+ の流出, また障害性の液性因子の流出を引き起こし, 結果として保存液中 pH の低下, アシドーシスとなることが推測される. その後 SNMP(WIT30)群においてはおおむね保存液中 pH は回復傾向を示し, SNMP(WIT60)群においては 10 例のうち 4 例は回復傾向, 6 例はよりアシドーシスが進行した. また SNMP(WIT30)と SNMP(WIT60)の間で, 一部統計学的な差が示された. 保存液中 pH が基準値である 7.4 に向け回復傾向を示した群においては, 室温機械灌流による酸素化, 栄養の供給により適切な代謝機能が回復したことで, 肝細胞による H^+ イオンの汲み上げが行われたことが示唆され, 一方でそれ以上にアシドーシスが進行した群においては, 健全な代謝機能を取

り戻すことができずに、更なる細胞膜破壊の進行による H^+ の流出が予想される。

Fig.4.1.21-24 には、灌流中のプロトン指数を示した。前述のとおり、プロトン指数は肝臓代謝機能の最重要要素である ATP 合成における中間代謝の駆動力となる、電気化学的なポテンシャル差を示しており、この値が大きいほど健全な中間代謝機能が予測される。理論にて示した通り、このプロトン指数は温度と膜内外の pH 差に依存するが、今回は細胞内の pH を 7.4 と仮定して、保存液中 pH との差から、膜内外の pH 差を決定した。本実験では、保存温度は一定の条件下で行ったことから、プロトン指数は液中 pH とほぼ同様の傾向を示した。しかしながら、この評価指標は温度依存性に対応していることから、異なる温度域の保存手法の比較や、灌流中に温度を徐々に上昇させる復温機械灌流法における普遍的な指標としても、応用が可能であるといえる。一方で今回は細胞内の pH を生体内同様に 7.4 と仮定して、保存液の調整、および評価指標の検討を行ったが、実際には液体の pH には温度依存性を有することが知られており、より優れた保存、あるいは適切な評価指標の確立には課題を有する。

Fig.4.1.25-28 には、プロトン指数の各時間における初期値からの変化量、Fig.4.1.29, 30 には灌流 0 分, 240 分における値を示した。これより、SNMP(WIT30)群、および SNMP(WIT60)群の 4 例では時間とともに代謝機能の改善が示され、臓器再生の傾向が示唆された。一方で SNMP(WIT0)群においては、プロトン指数は低下傾向を示した。ここで考えられる原因として、適切な灌流が肝臓全体でおこなえていなかった、言い換えれば灌流が適切に行うことができなかった領域が存在したことが予想される。室温や恒温域での保存では、灌流不全領域が生じた場合、そこでは酸素や栄養の供給量が十分ではないにもかかわらず、代謝は進行することで細胞は酸欠、栄養不足となり、結果として健全な臓器機能を持った臓器であっても、その機能は失われ障害を受けるリスクを有している。低温域で

の保存であれば、灌流不全領域においても最低限低温を維持し、代謝機能は抑制されていることから、そのリスクは小さい。障害を有した臓器を再生するためには、積極的な代謝活性は必要不可欠である。そのため、適切な肝臓全体の灌流による保存が重要であるが、ただ流量を上昇するだけでは血管圧力は上昇し、血管内皮に障害を与えてしまうので、その圧力と流量のバランスや、灌流中のグラフトの保持法、拍動流の活用など流体力学的観点から、より詳細な灌流条件の検討が今後必要であるといえる。

Fig.4.1.31-34 には、臓器スケールでの代謝指標として提案した肝臓代謝指数を示した。これは、プロトン指数はあくまで単一細胞において、ATP 合成における中間代謝の指標であり、臓器全体での代謝指標ではないことから、最終的な代謝指標である酸素消費量と無次元化したプロトン指数を掛け合わせることで臓器スケールでの代謝指標として定義した。これより、統計学的な差はなかったが、SNMP(WIT30)群において高値を示し、SNMP(WIT0)群においても最終的には同程度の値は示した。一方で、SNMP(WIT60)群では灌流 4 時間を通じてやや低値を示した。これは Fig.4.1.35, 36 に示した各実験における、灌流 0, 4 時間におけるそれぞれの肝臓代謝指数からも明らかであり、温阻血時間 30 分までの実験群においては良好な代謝機能とその回復を示唆した。

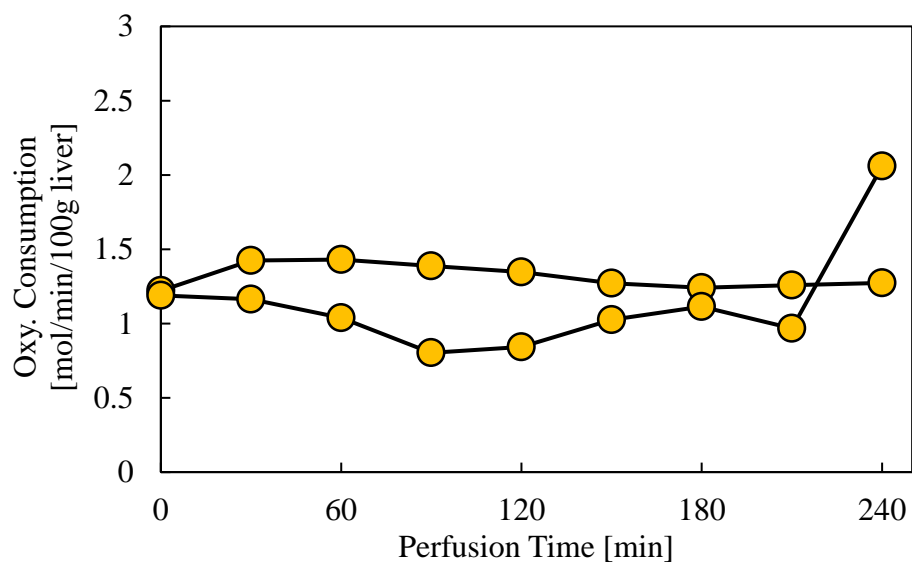


Fig.4.1.13 Oxy. Consumption during SNMP with WIT 0min

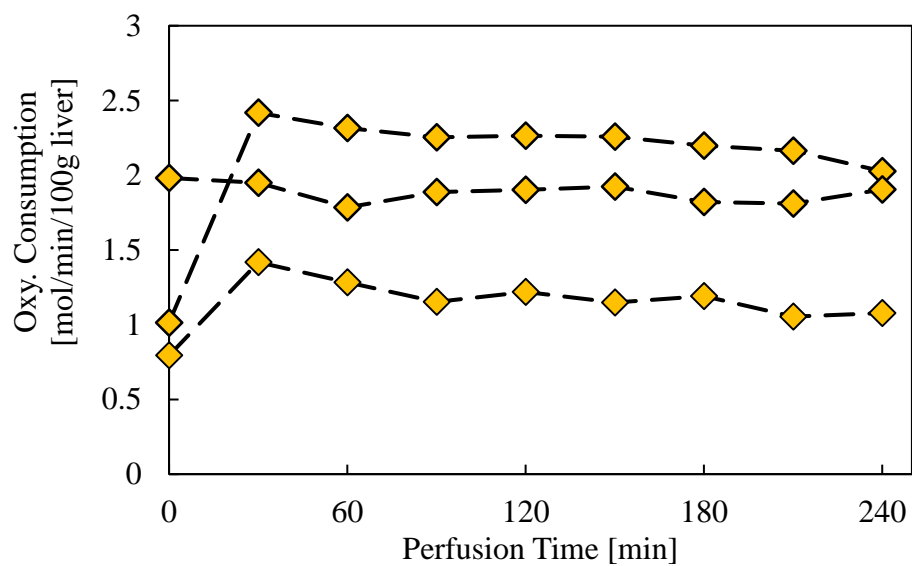


Fig.4.1.14 Oxy. Consumption during SNMP with WIT 30min

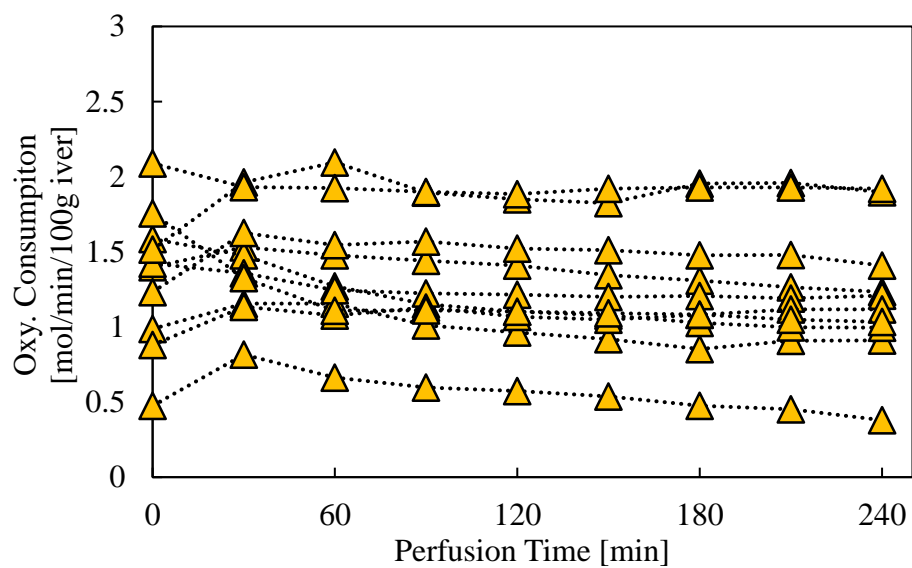


Fig.4.1.15 Oxy. Consumption during SNMP with WIT 60min

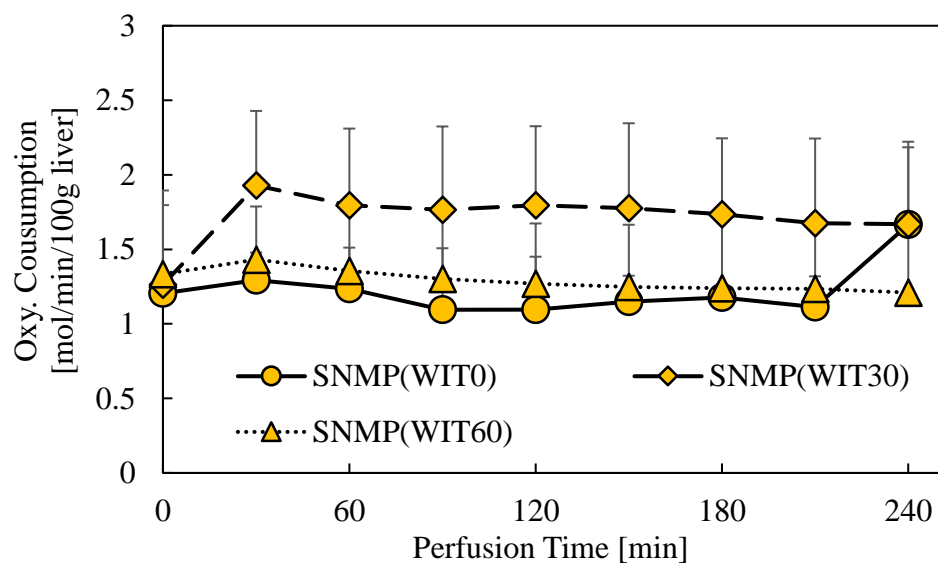


Fig.4.1.16 Oxy. Consumption during SNMP

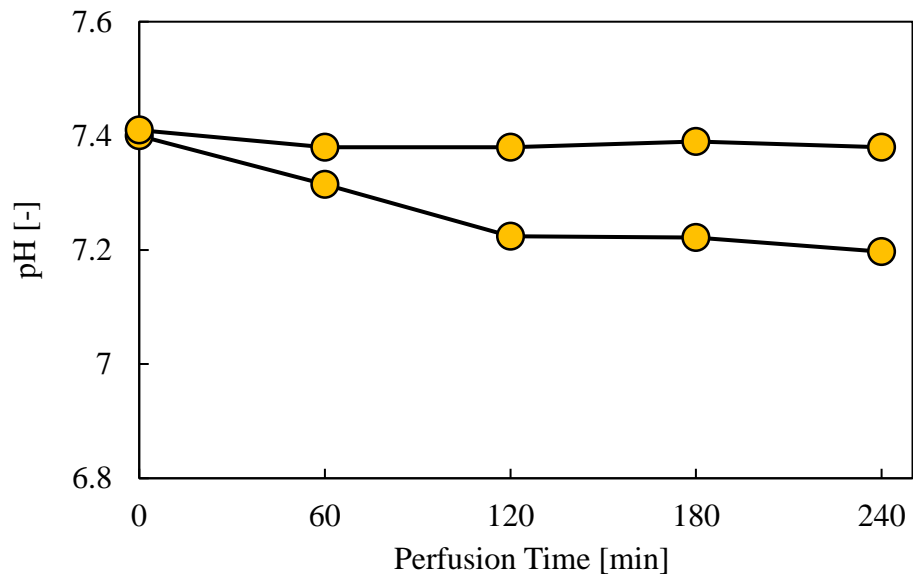


Fig.4.1.17 pH of perfusate during SNMP with WIT 0min

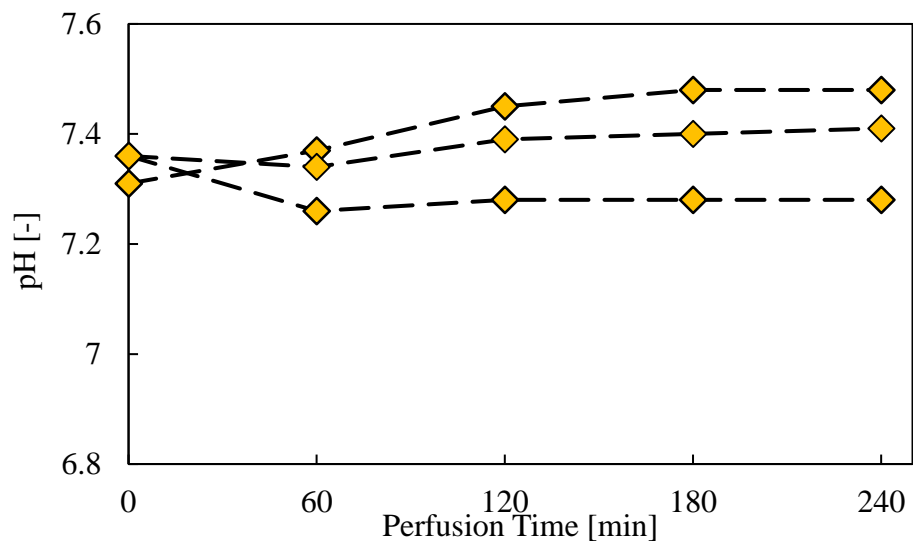


Fig.4.1.18 pH of perfusate during SNMP with WIT 30min

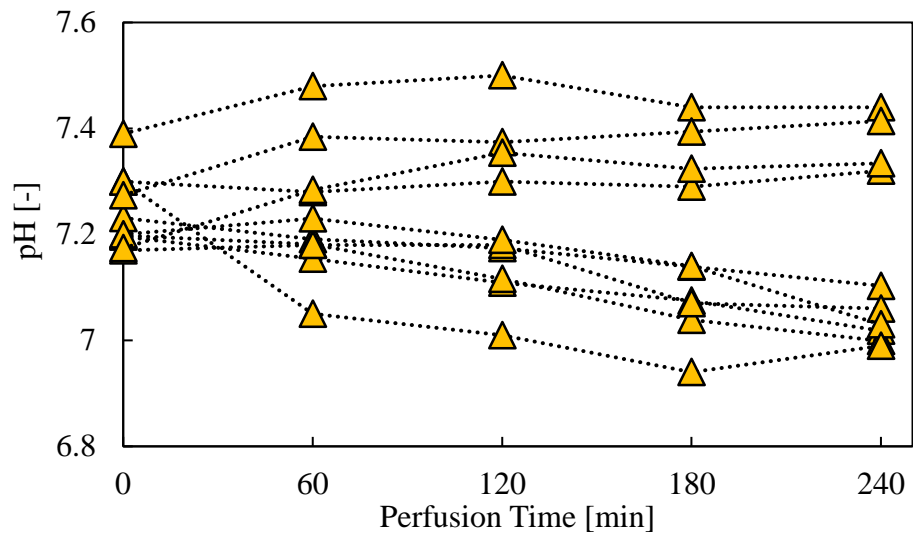


Fig.4.1.19 pH of perfusate during SNMP with WIT 60min

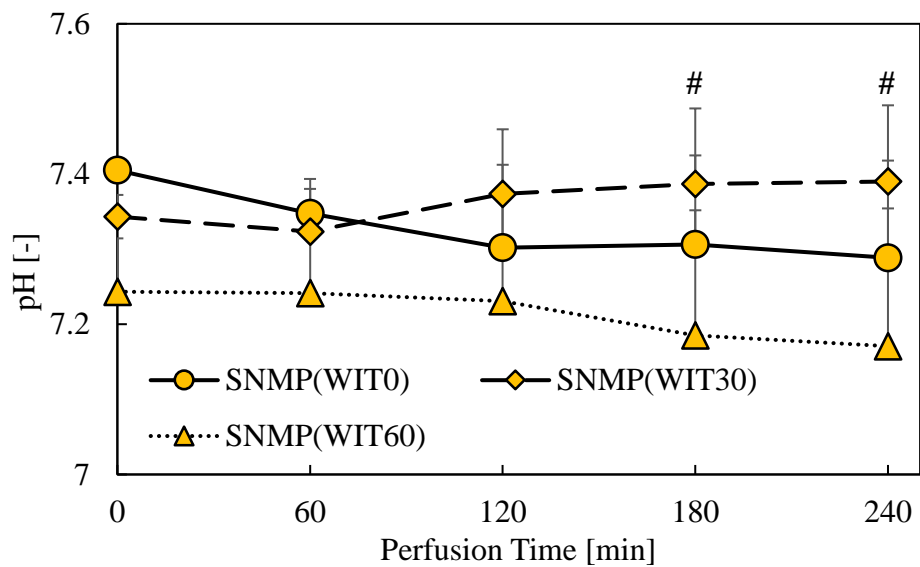


Fig.4.1.20 pH of perfusate during SNMP

*SNMP(WIT0) vs. SNMP(WIT30), #SNMP(WIT30) vs. SNMP(WIT60); $p < 0.05$

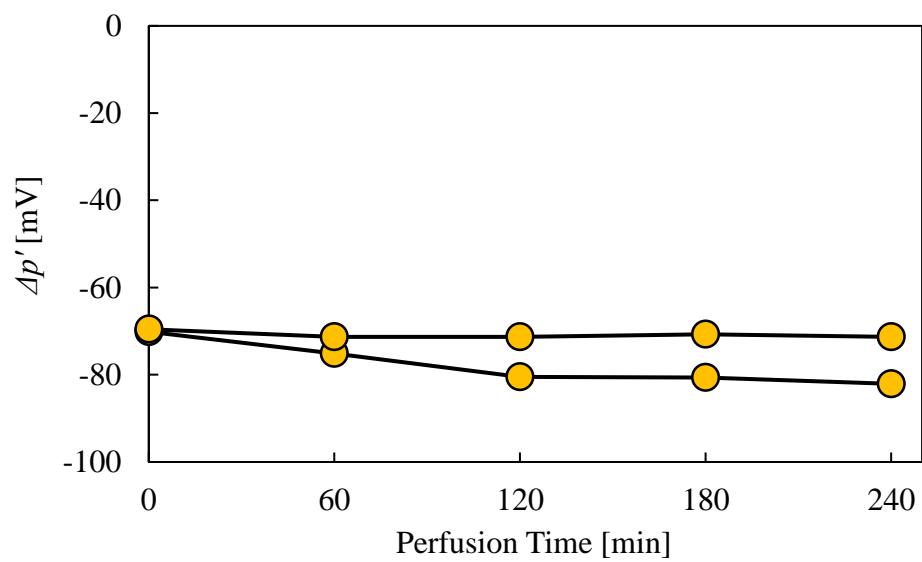


Fig.4.1.21 Proton index during SNMP with WIT 0min

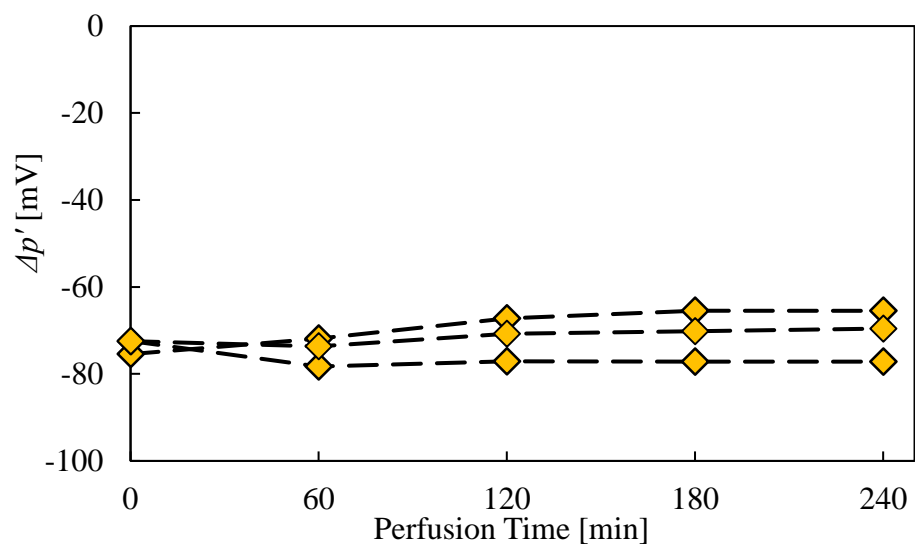


Fig.4.1.22 Proton index during SNMP with WIT 30min

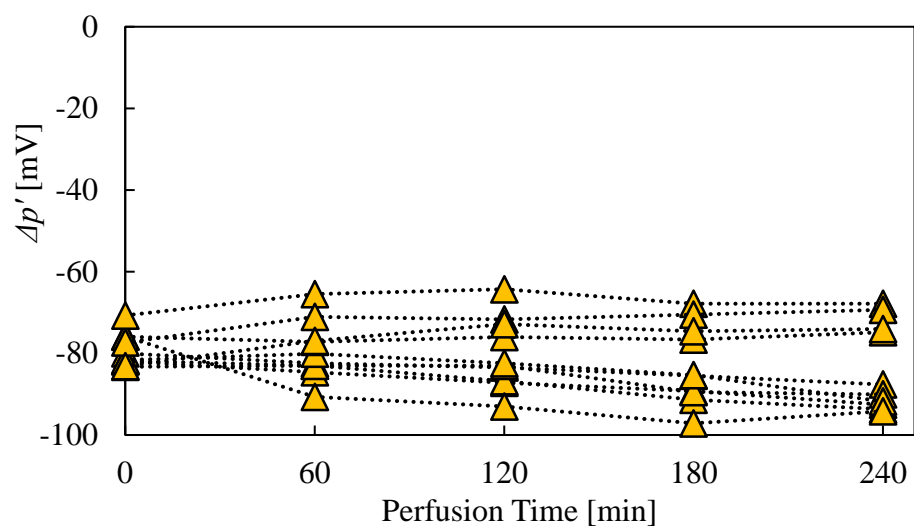


Fig.4.1.23 Proton index during SNMP with WIT 60min

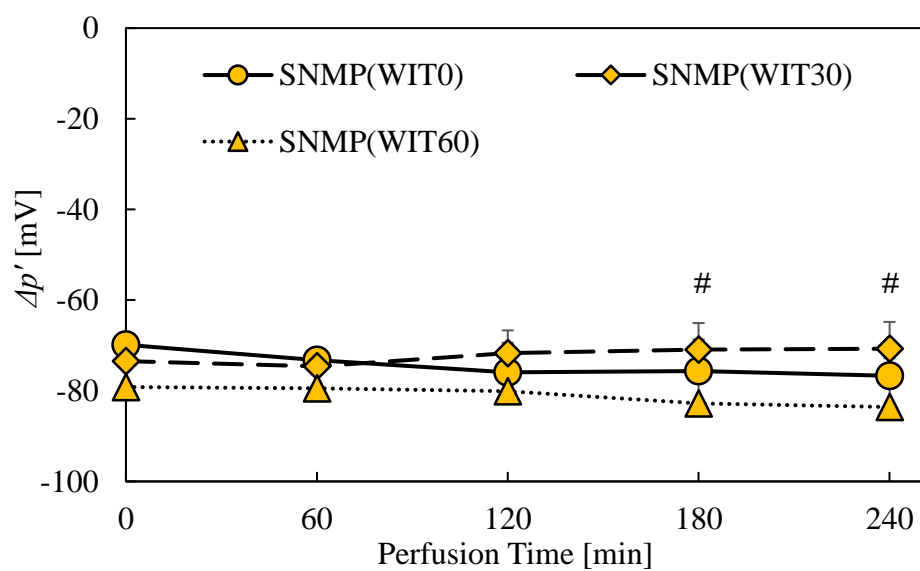


Fig.4.1.24 Proton index during SNMP

*SNMP(WIT0) vs. SNMP(WIT60), #SNMP(WIT30) vs. SNMP(WIT60); $p < 0.05$

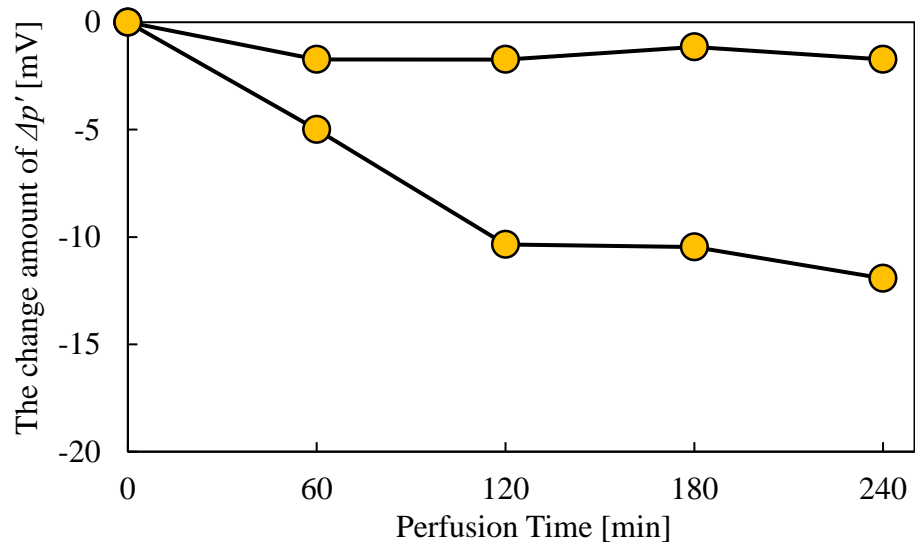


Fig.4.1.25 The change amount of proton index during SNMP with WIT 0min

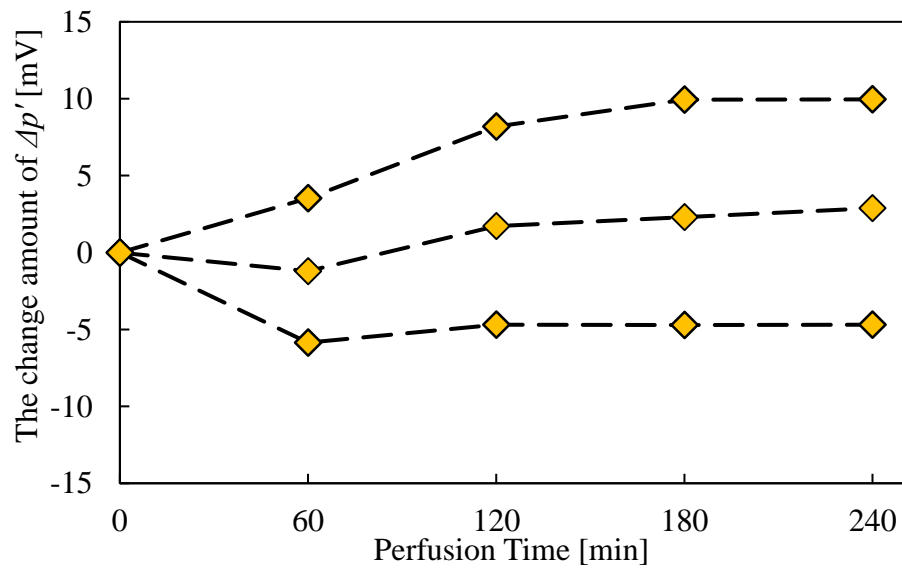


Fig.4.1.26 The change amount of proton index during SNMP with WIT 30min

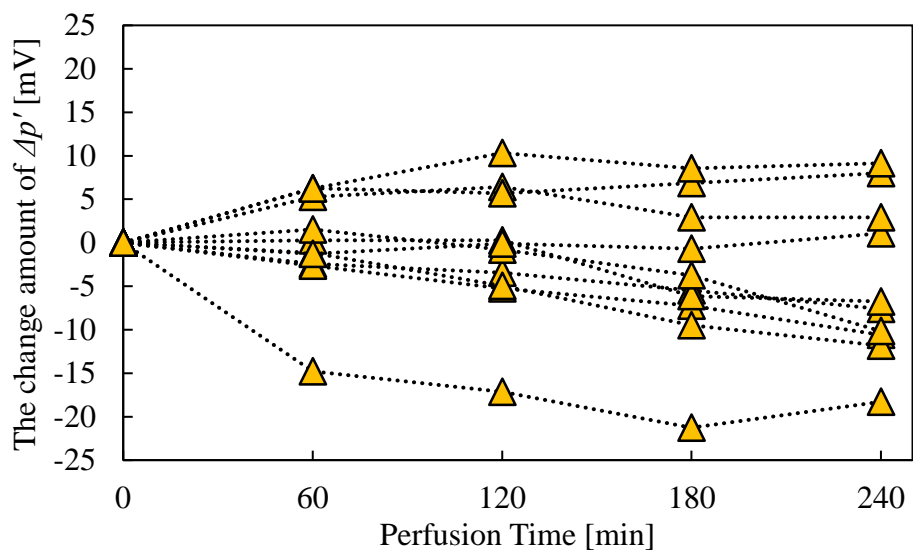


Fig.4.1.27 The change amount of proton index during SNMP with WIT 60min

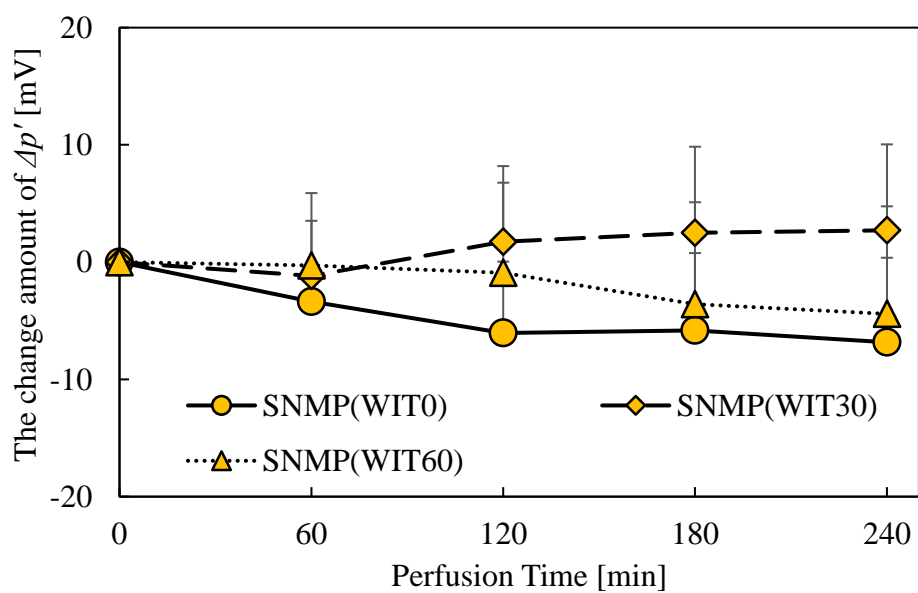


Fig.4.1.28 The change amount of proton index during SNMP

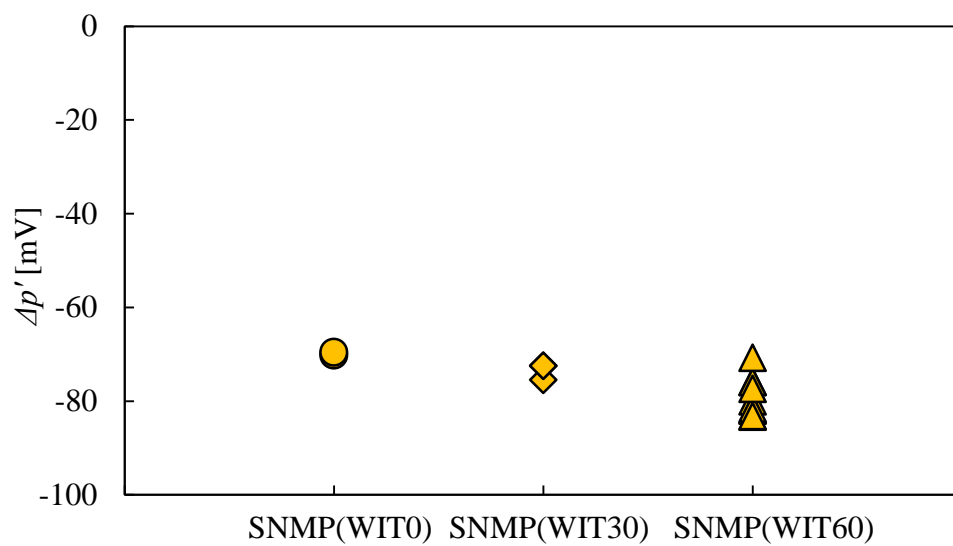


Fig.4.1.29 Proton index during SNMP at 0min

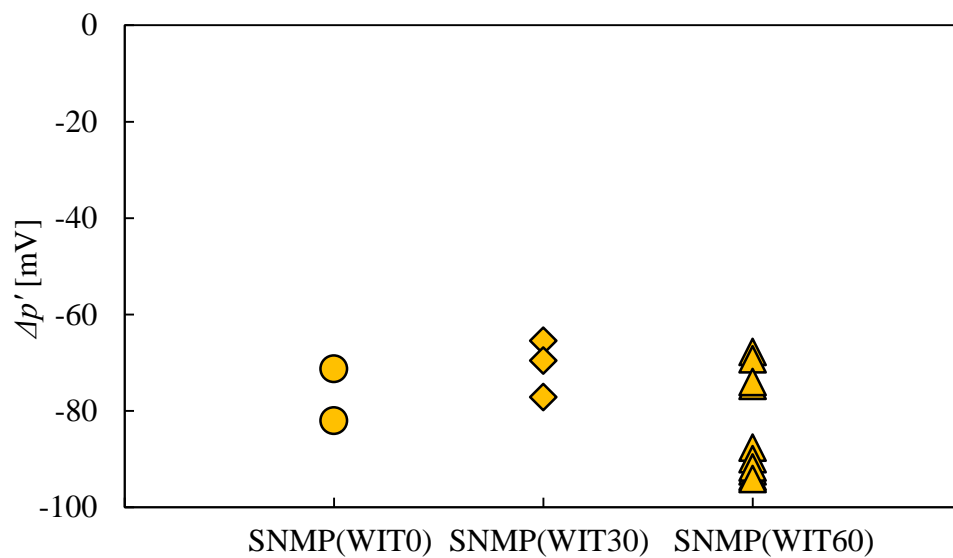


Fig.4.1.30 Proton index during SNMP at 240min

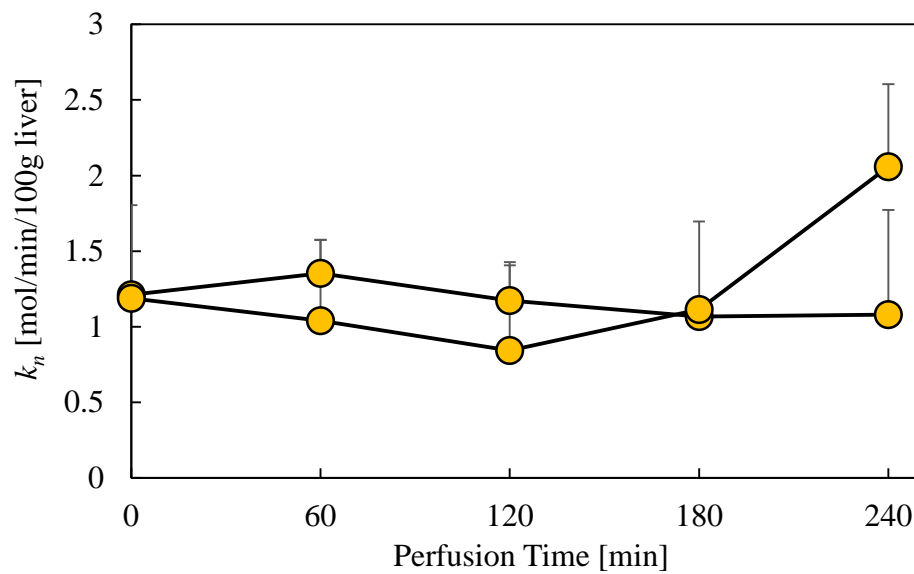


Fig.4.1.31 Metabolism index during SNMP with WIT 0min

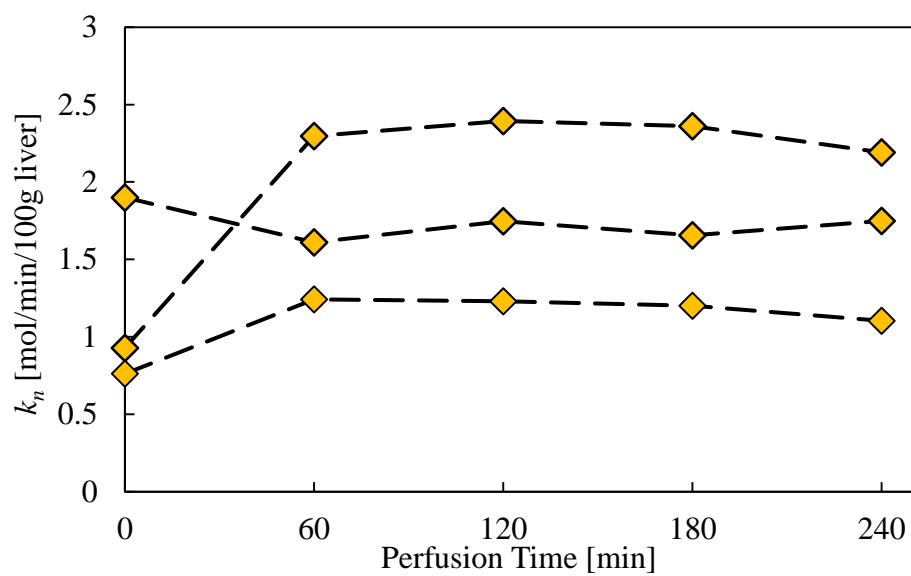


Fig.4.1.32 Metabolism index during SNMP with WIT 30min

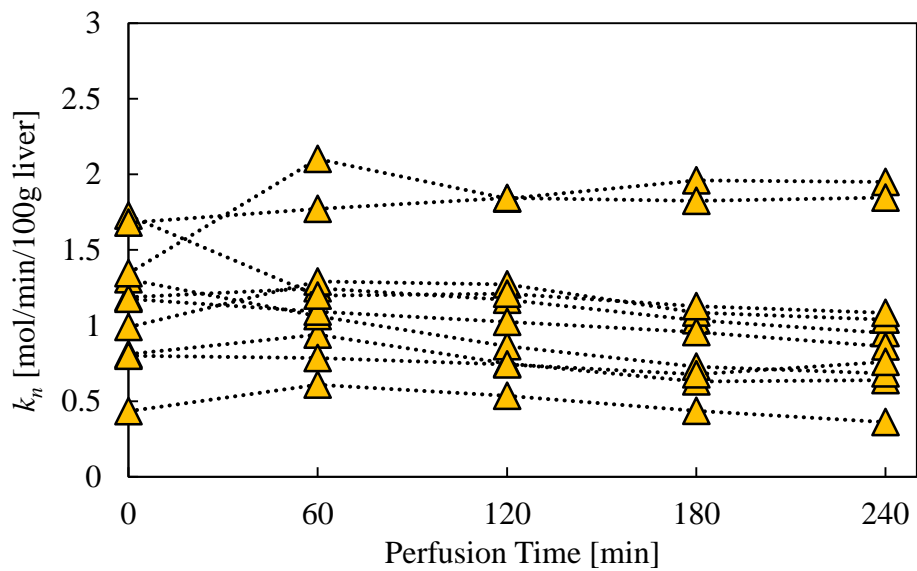


Fig.4.1.33 Metabolism index during SNMP with WIT 60min

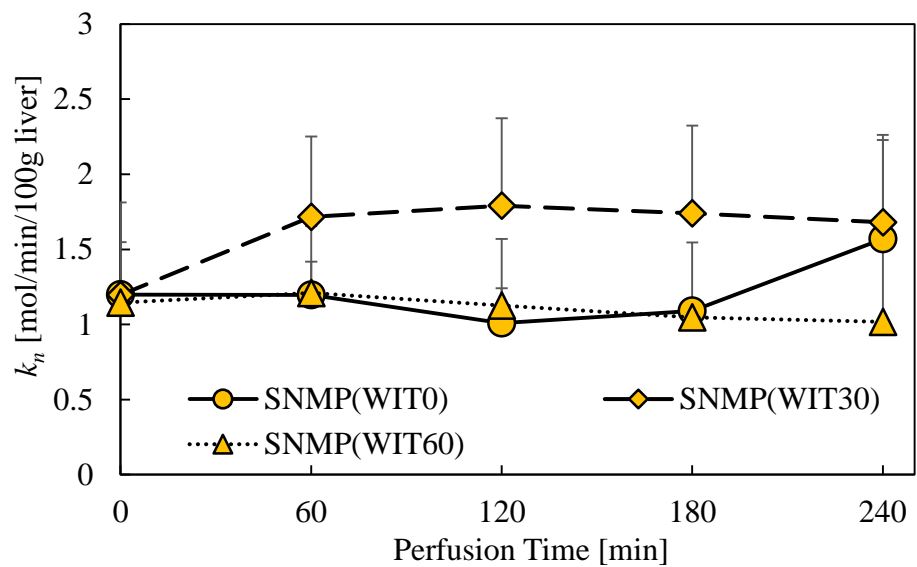


Fig.4.1.34 Metabolism index during SNMP

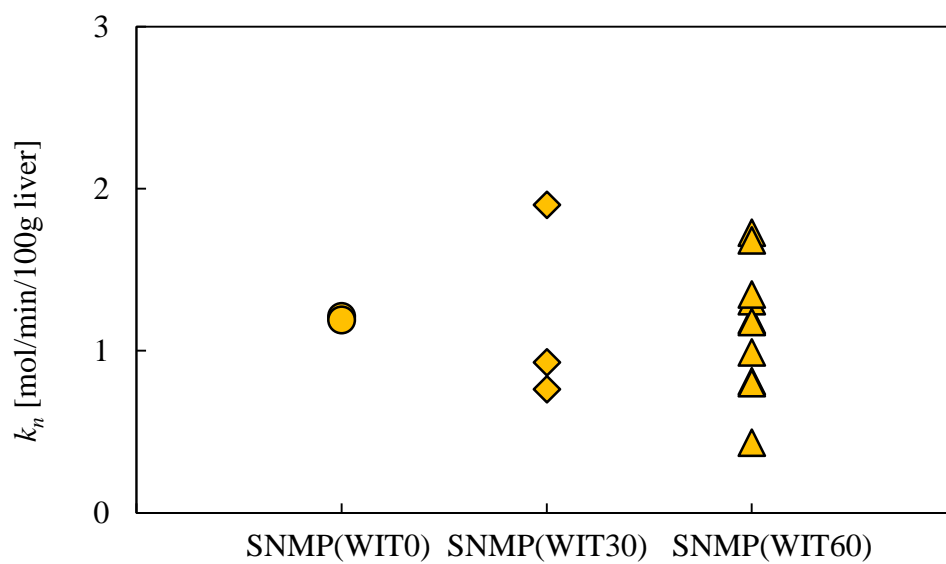


Fig.4.1.35 Metabolism index during SNMP at 0min

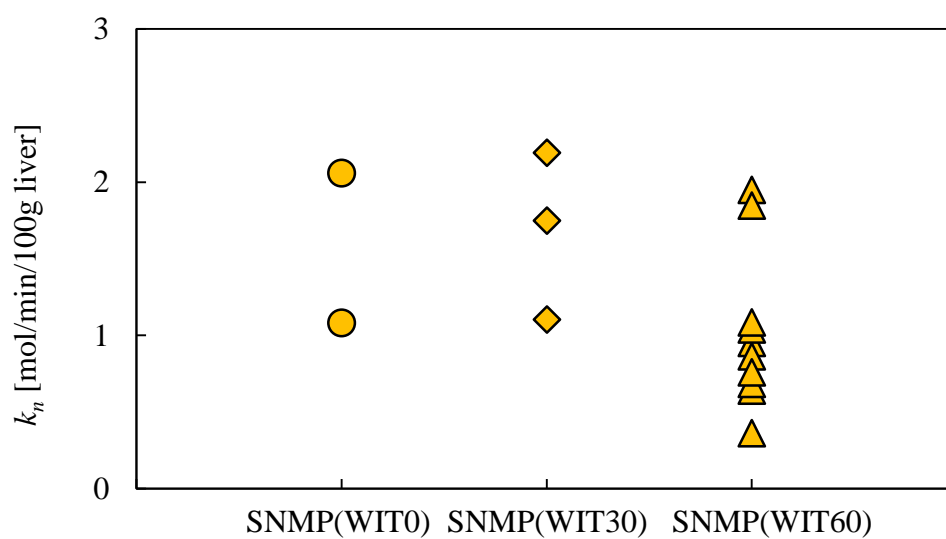


Fig.4.1.36 Metabolism index during SNMP at 240min

4.1.4 体外血液再灌流モデルによる流動指標

ここからは、4 時間の単純冷却保存、あるいは室温機械灌流を行った後に、その臓器機能と保存技術の検証に行った体外血液再灌流モデル実験について、その流動指標を示す。用いた指標については、保存時と同様に灌流量と血管圧力、またそれに伴う血管抵抗である。Fig.4.1.37, 38 には門脈、肝動脈それぞれの灌流量を示したが、再灌流は全ての実験において一定の流量によって行った。

Fig.4.1.39-42 には門脈、肝動脈の血管圧力、血管抵抗を示した。これより、単純冷却保存後の条件群では、門脈、肝動脈ともに再灌流直後から上昇傾向を示した。単純冷却保存法では、低温で保存液に浸透することで代謝機能を抑制することで臓器機能を温存するが、その条件下でもわずかながら代謝は進行することから、完全な臓器機能の保存は困難である。そのため再灌流による再酸素化により、温阻血時間なしの肝臓においても多少の虚血再灌流障害を生じるが、室温機械灌流群では保存中も酸素化による適切な代謝を行っていたことから、虚血再灌流障害は抑制され、血管圧力・抵抗についても比較的低値を維持した。しかしながら最も厳しい条件で肝臓を摘出した SNMP(WIT60)群における肝動脈圧では、単純冷却群と比し絶対値では低値を示したものの、再灌流直後の圧上昇の傾きでは同等の傾向を示した(Fig.4.1.43,44)。ただし、CS(WIT60)群と比べると、統計学的に有意に低値を示した。さらに SNMP(WIT0)群、および SNMP(WIT30)群については、臨床的な基準となる CS(WIT0)群と比べても統計学的に有意に低値を示したことから、温阻血時間 30 分までの臓器については室温機械灌流による流動機能の再生が示され、臨床的な基準と同等以上の良好な結果を示した。以上より、流動指標において心停止後肝臓に対する室温機械灌流法の有用性が示された。

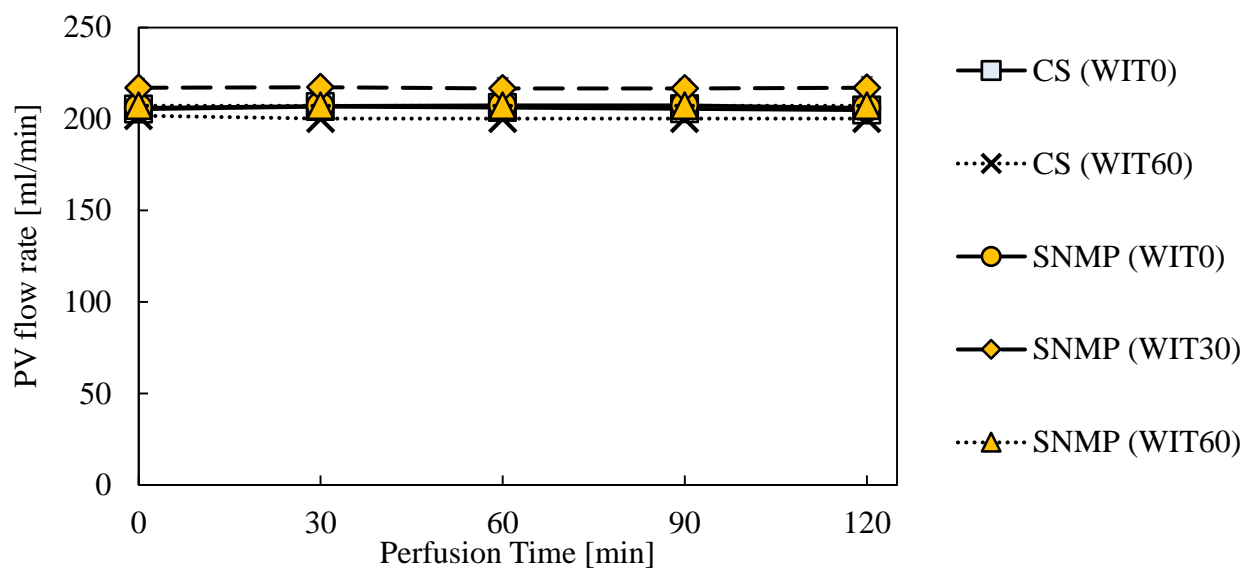


Fig.4.1.37 Flow rate of PV during IRM after CS or SNMP

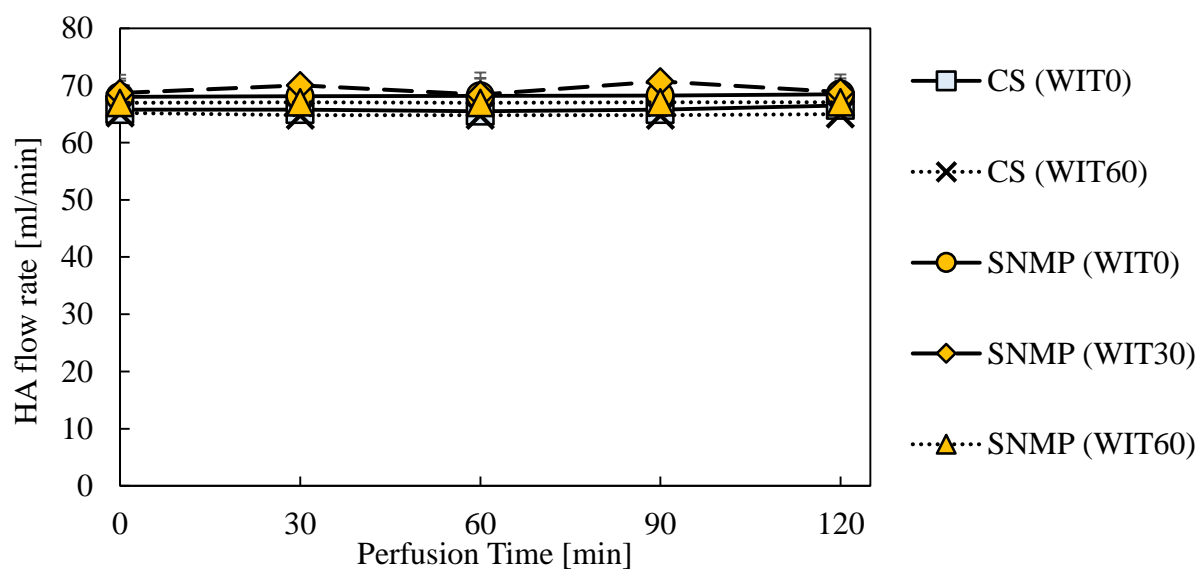


Fig.4.1.38 Flow rate of HA during IRM after CS or SNMP

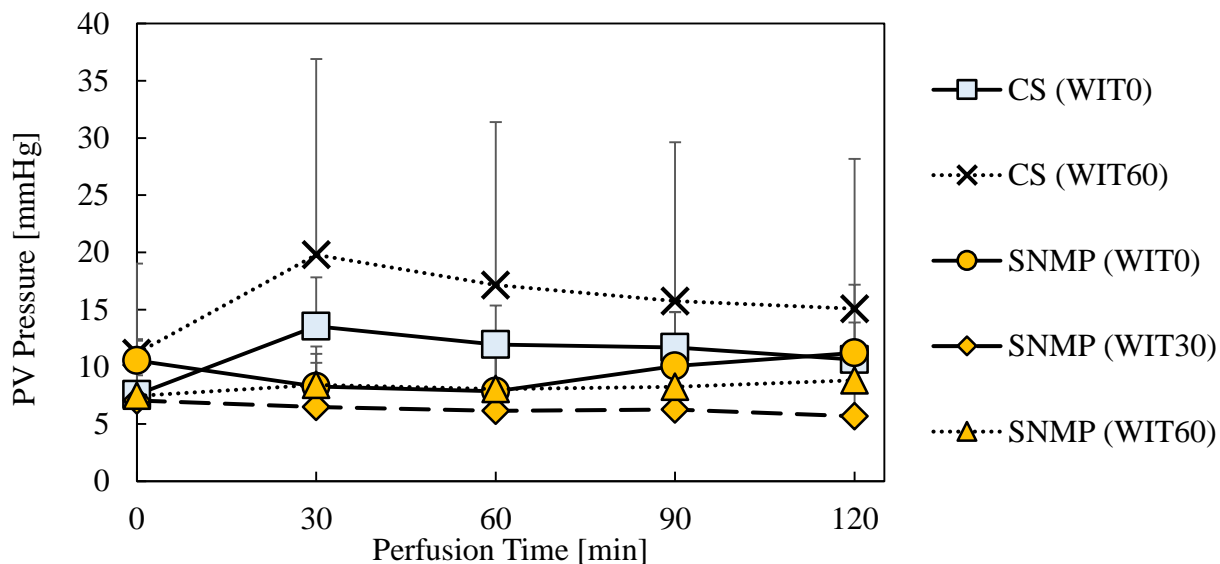


Fig.4.1.39 PV Pressure during IRM after CS or SNMP

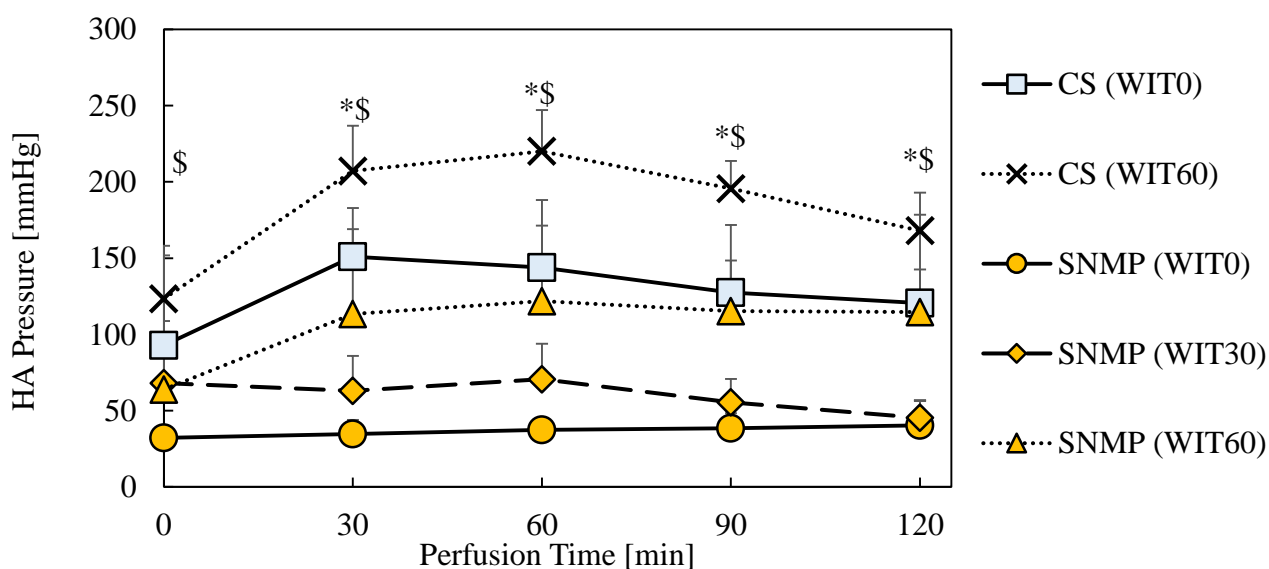


Fig.4.1.40 HA Pressure during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT0) vs SNMP(WIT60),
\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); p<0.05

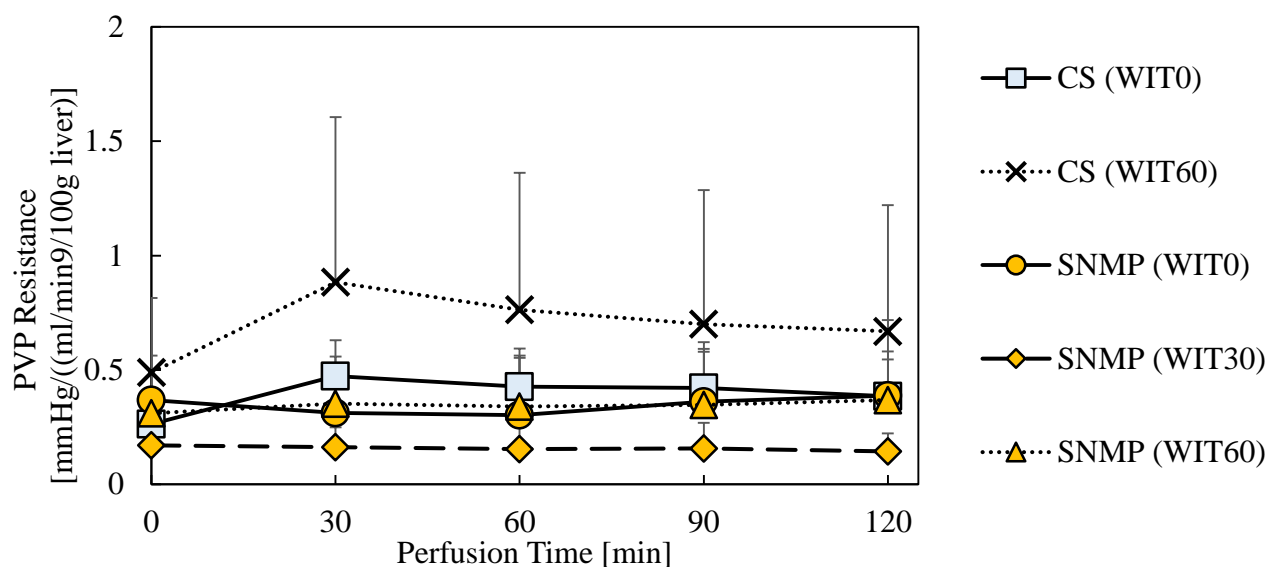


Fig.4.1.41 PVP Resistance during IRM after CS or SNMP

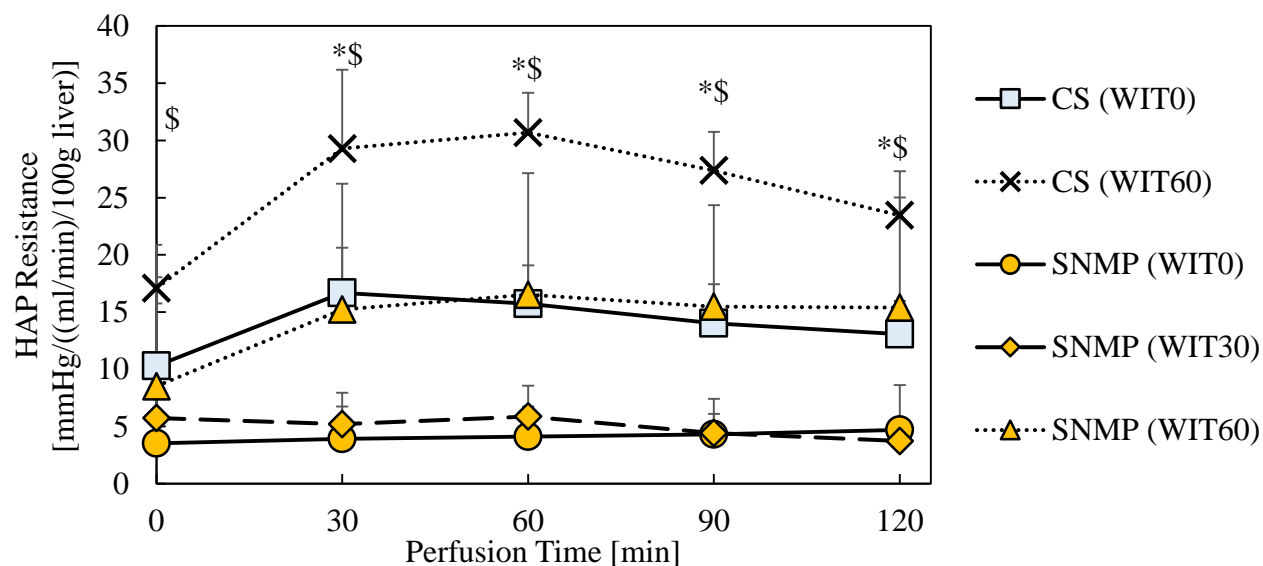


Fig.4.1.42 HAP Resistance during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT0) vs SNMP(WIT60),

\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); $p < 0.05$

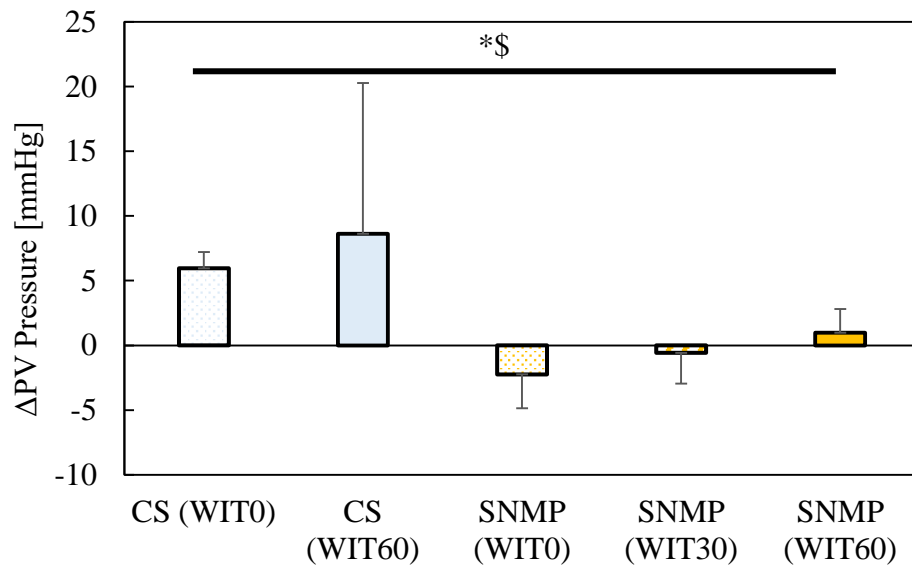


Fig.4.1.43 The change amount of PVP during IRM from 0 to 30min

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT0) vs SNMP(WIT60),
\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); $p < 0.05$

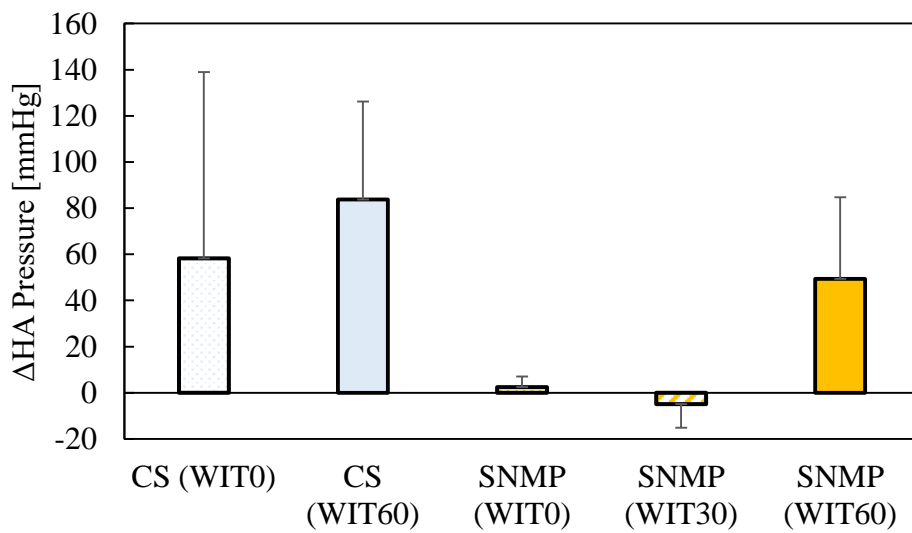


Fig.4.1.44 The change amount of HAP during IRM from 0 to 30min

4.1.5 体外血液再灌流モデルによる肝機能指標

体外血液再灌流モデル実験による肝機能指標である各種逸脱酵素，および血液ガス分析によるバイオマーカーの測定結果を示す．Fig.4.1.45-47 には肝細胞が破壊されることで流出する逸脱酵素であり，肝機能指標となる AST，Fig.4.1.48-50 には同様に肝機能指標である LDH の再灌流中の蓄積量，30 分毎の流出量，再灌流 2 時間での総流出量を示した．これより，AST，LDH 蓄積量では，共に臨床的な基準となる CS(WIT0)群と比し，室温機械灌流群では温阻血時間 60 分と極めて厳しい条件下で摘出した実験群においても同等以上の良好な結果を示した．また，各群間の差は，特に虚血再灌流障害の傾向が顕著に表れる再灌流初期 30 分間での流出量において，統計学的な差はなかったものの室温機械灌流群においてやや良好な結果を示し，室温機械灌流法による肝機能の改善の傾向が示唆された．再灌流 2 時間での総流出量についても同様の傾向であり，統計学的な差はなかった．また Fig.4.1.51 には胆管障害の指標となる逸脱酵素 ALP，Fig.4.1.52 には血管内皮障害の指標であるヒアルロン酸の蓄積量を示した．これより，ヒアルロン酸については CS(WIT0)群と比し，SNMP(WIT60)群は統計学的な差は示されなかったが，ALP については有意に高値を示した．胆管機能は特に温阻血による障害を受けやすいとされており，温阻血時間 60 分と極めて厳しい条件では，室温機械灌流法を施したとしても，その機能は大きな障害を有し，機能再生は困難であることが示唆された．

また Fig.4.1.53 には酸塩基の指標となる再灌流液中のラクテート，Fig.4.1.54 には糖代謝の指標となるグルコースを示した．これらの指標は特に肝臓代謝機能に依存する縦横指標であるが，それぞれ特に SNMP(WIT30)群で統計学的な差はなかったものの，良好な結果を示した．一方で，SNMP(WIT60)群においては，若干ではあるが低値を維持し，代謝機能の障害が示唆された．

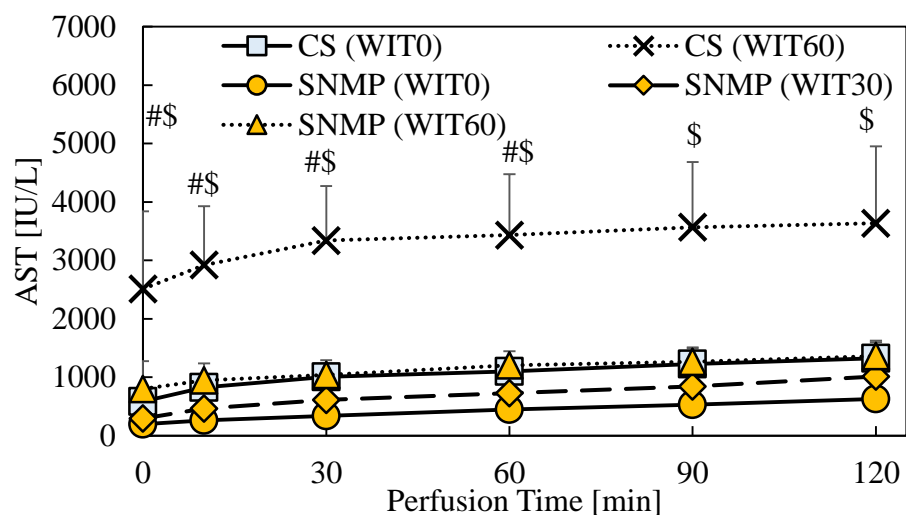


Fig.4.1.45 The amount of AST during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT0) vs SNMP(WIT60),
\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); $p < 0.05$

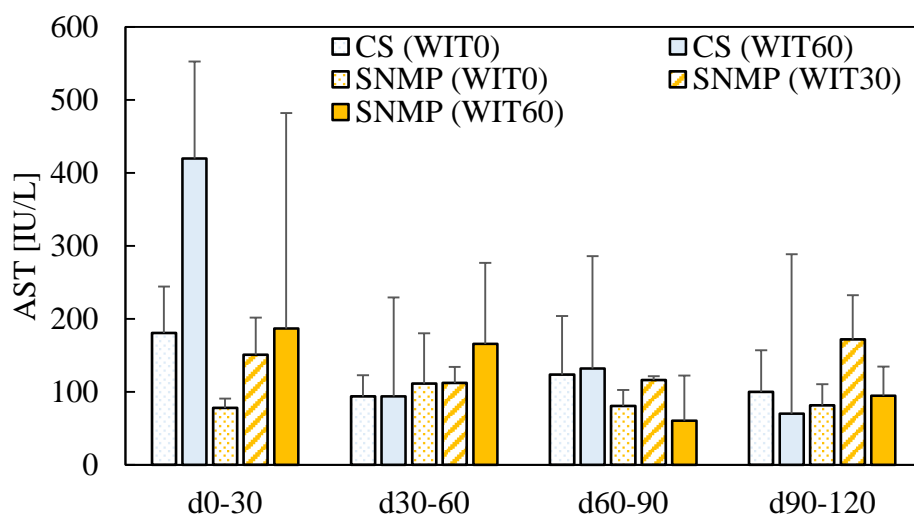


Fig.4.1.46 The release of AST during IRM after CS or SNMP

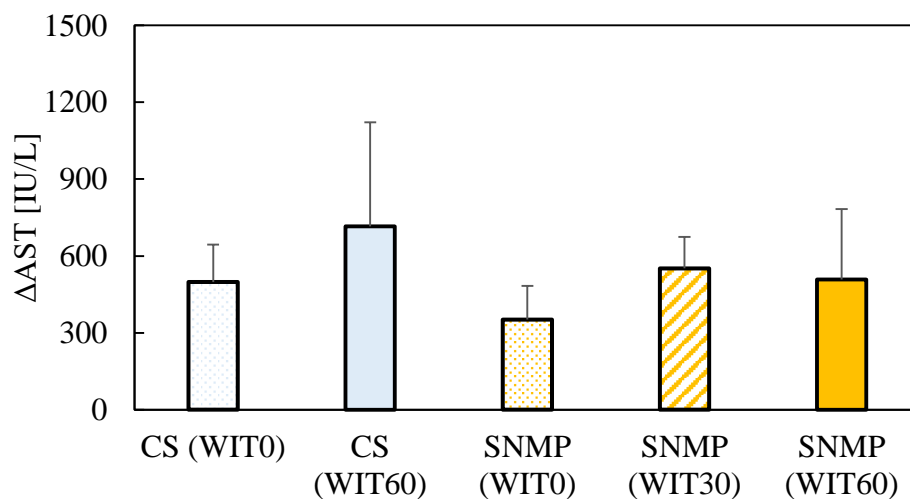


Fig.4.1.47 The release of AST during IRM after CS or SNMP in 120 min

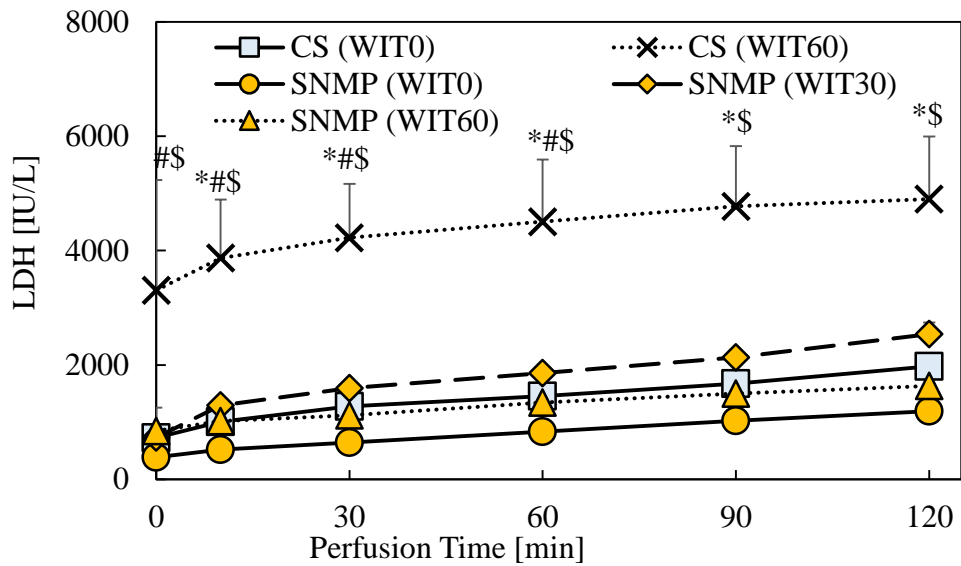


Fig.4.1.48 The amount of LDH during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT0) vs SNMP(WIT60),
\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); $p < 0.05$

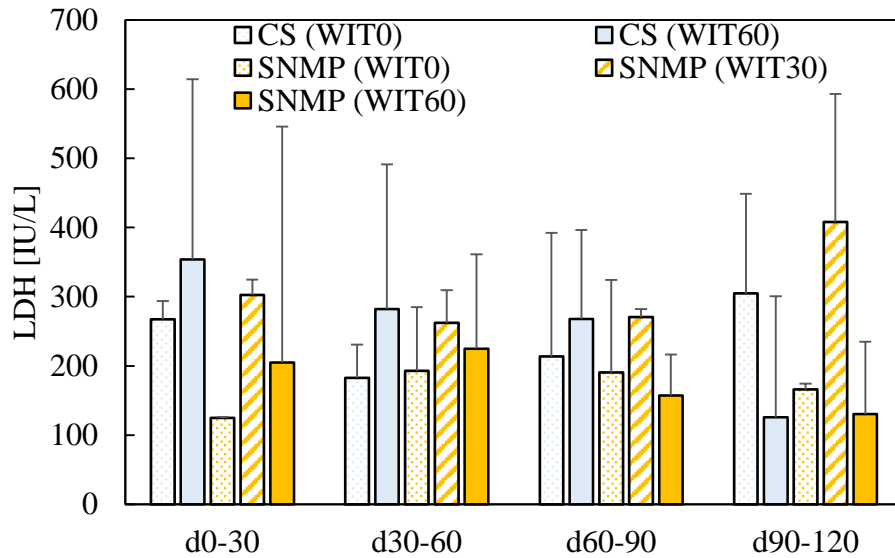


Fig.4.1.49 The release of LDH during IRM after CS or SNMP

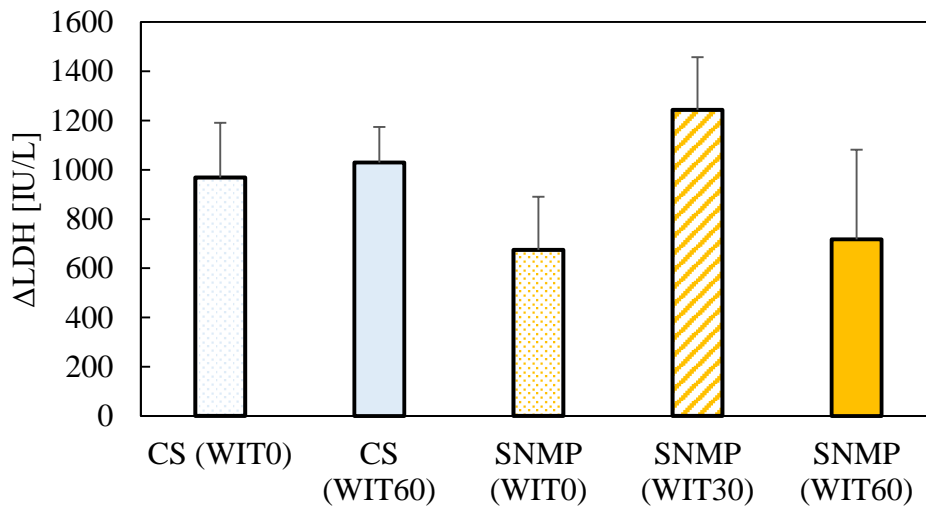


Fig.4.1.50 The release of LDH during IRM after CS or SNMP in 120 min

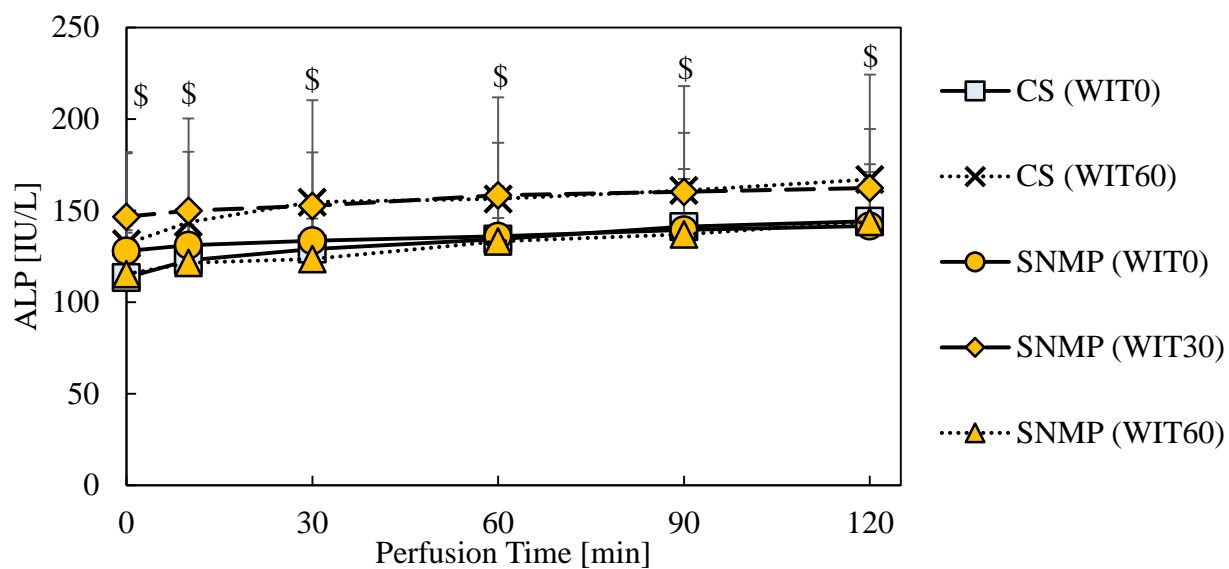


Fig.4.1.51 The amount of ALP during IRM after CS or SNMP

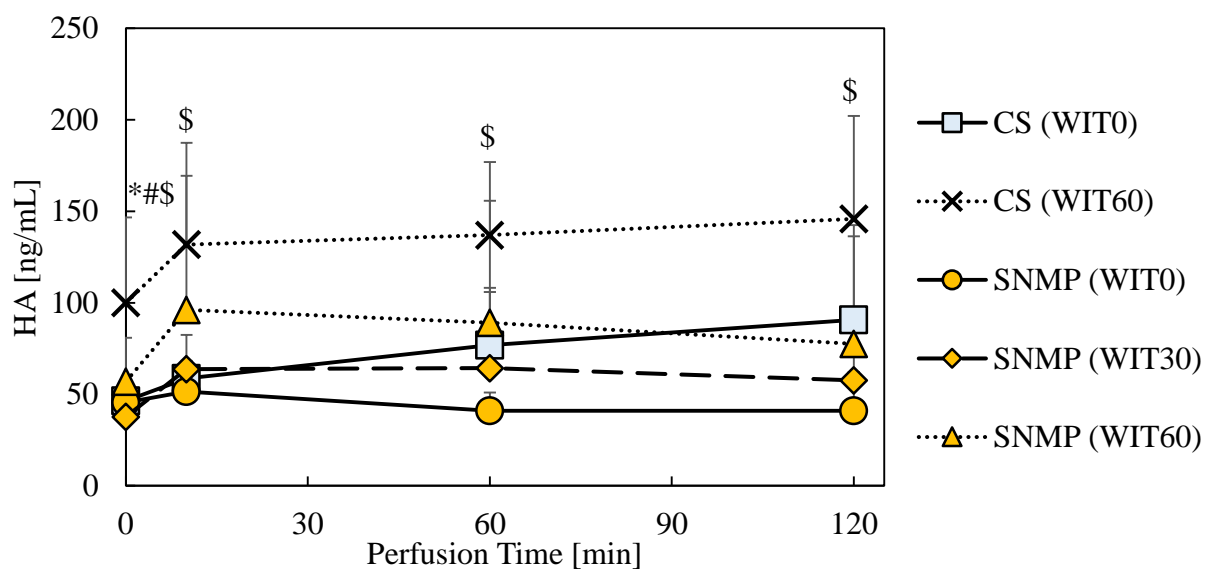


Fig.4.1.52 The amount of HA during IRM after CS or SNMP

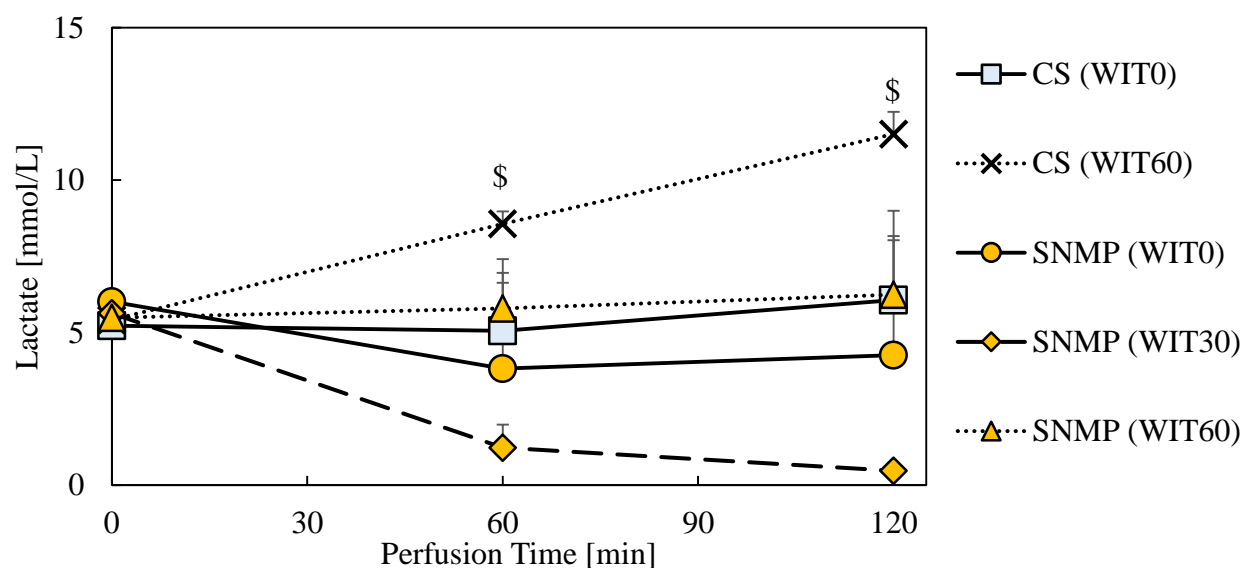


Fig.4.1.53 Lactate level of perfusate during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT0) vs SNMP(WIT60),

\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); $p < 0.05$

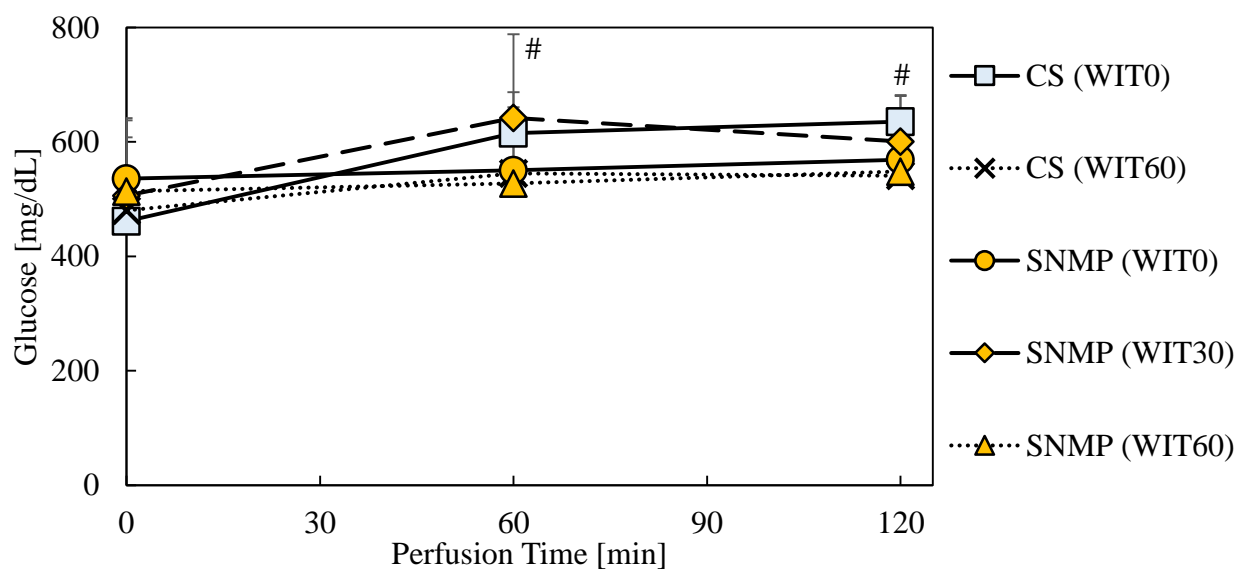


Fig.4.1.54 Glucose level of perfusate during IRM after CS or SNMP

4.1.6 体外血液再灌流モデルによる肝臓代謝因子

体外血液再灌流モデル実験における酸素消費量や灌流液中の pH, またそれに伴う肝臓代謝因子を示す. Fig.4.1.55 には再灌流における酸素消費量, Fig.4.1.56 には再灌流液中の pH を示した. これより, 臨床的な基準となる CS(WIT0)群と比し SNMP(WIT30)では統計学的な差は示されなかったものの高値を示し, 代謝機能の改善傾向が示された. 一方で SNMP(WIT60)群においては, 最も厳しい臓器機能が予想される CS(WIT60)と同程度の値を示したことから, その代謝機能は強い障害を受けていることが示唆される. 再灌流液の pH では CS(WIT60)群が虚血再灌流障害による細胞膜の破壊を通じた H⁺の流出や, 障害性の液性因子の流出によるアシドーシスの傾向に向かったのと比し, その他の群では初期値にばらつきはあったものの, ある程度一定の値を維持した. しかしながら, 全体的に基準値の pH である 7.4 よりかはやや高値を示していたことから, 使用したドナー血液の状態, あるいはその個体差についての課題が示唆され, 今後も議論が必要である.

Fig.4.1.57-60 には, ATP 合成における中間代謝の駆動力となるプロトン指数, およびその初期値からの変化量を示した. これより, SNMP (WIT0) 群は, 統計学的に有意に良好な結果を示し, SNMP(WIT30)群においても基準となる CS(WIT0)群と同程度の値を示した. 一方で, SNMP(WIT60)群においては統計学的な差は示されなかったものの, これらの群と比し低値を示し, さらには下降傾向を示したことから保存後であっても非常に厳しい代謝機能であることが予想された. Fig.4.1.61-64 には ATP 合成のための, 臓器スケールでの代謝指標として提案した肝臓代謝指標を示した. これより, 温阻血時間 30 分までの臓器であれば, 室温機械灌流法において代謝機能は改善され, 臨床的な基準と同等以上の代謝機能を有していることが明らかであるが, 一方で SNMP(WIT60)群にお

いてはプロトン指数と同様に最も厳しい臓器機能が予想される CS(WIT60)群と、統計学的にも同程度の代謝機能を示した。

流動指標や肝機能指標を含めて考慮しても、臨床的な基準となる CS(WIT0)群と比し温阻血時間 60 分間では明らかに劣る項目が多く、虚血再灌流障害の傾向が顕著であることから厳しい臓器機能が予想される一方で、温阻血時間 30 分の場合には CS(WIT0)群と同等以上の結果を示した。以上より、現状の技術では温阻血時間 30 から 60 分の間に機能再生が困難な境界線が存在することが予想されるが、少なくとも温阻血時間 30 分程度であれば室温機械灌流法による臓器再生が可能であると考えられる。

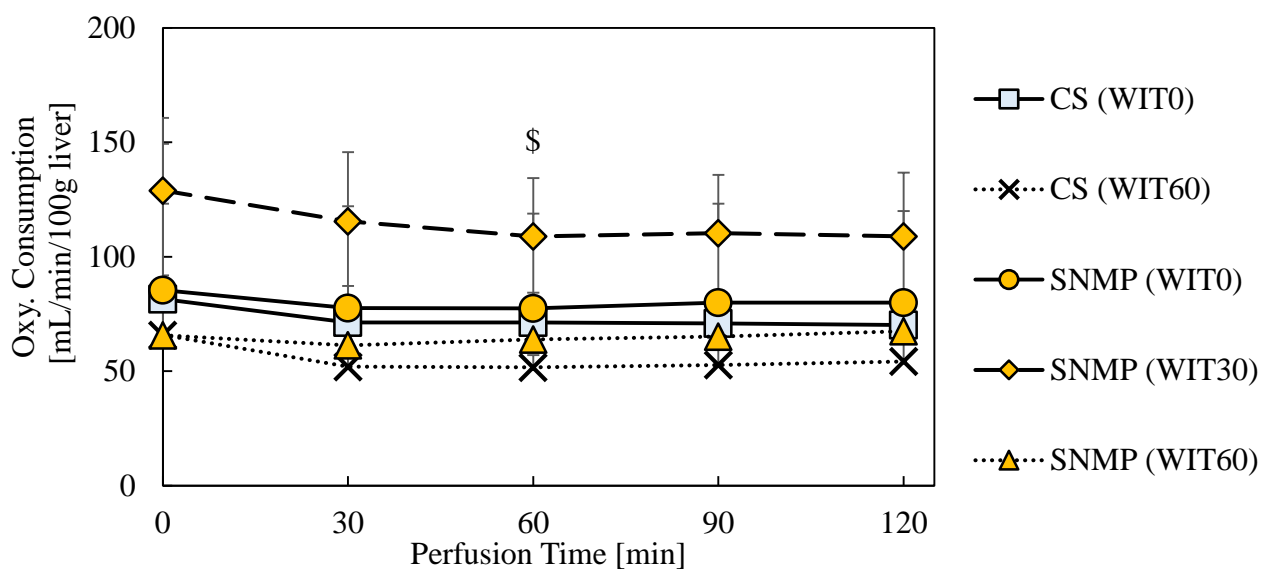


Fig.4.1.55 Oxy. Consumption during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT60) vs SNMP(WIT60),
\$CS(WIT60) vs SNMP(WIT60); p<0.05

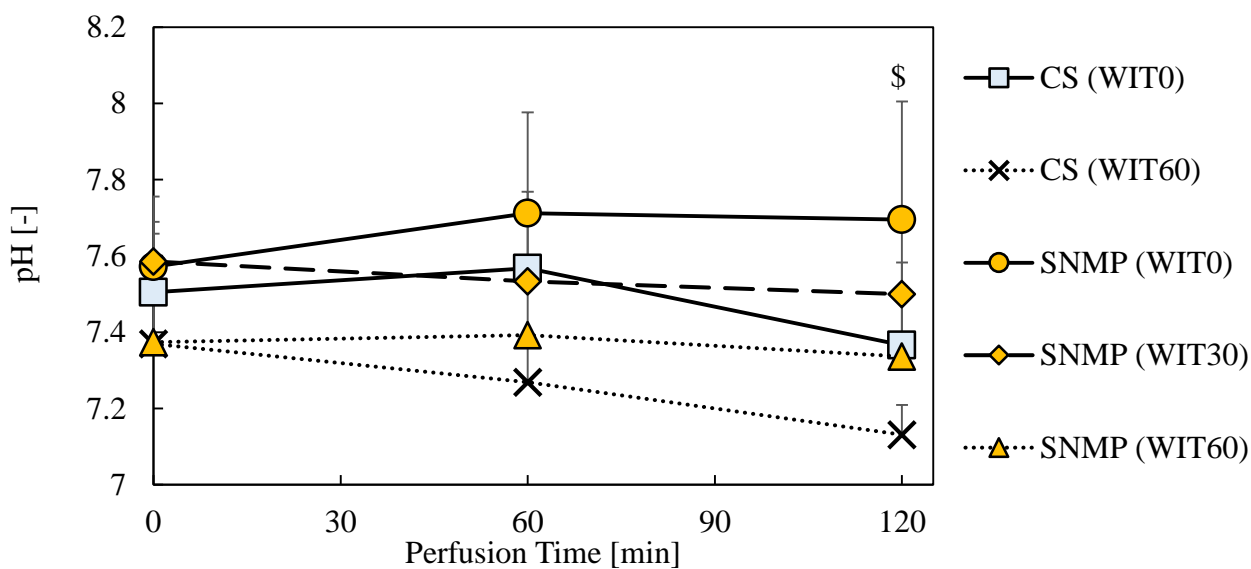


Fig.4.1.56 pH of perfusate during IRM after CS or SNMP

*SNMP(WIT0) vs. SNMP(WIT30), #SNMP(WIT30) vs. SNMP(WIT60); p<0.05

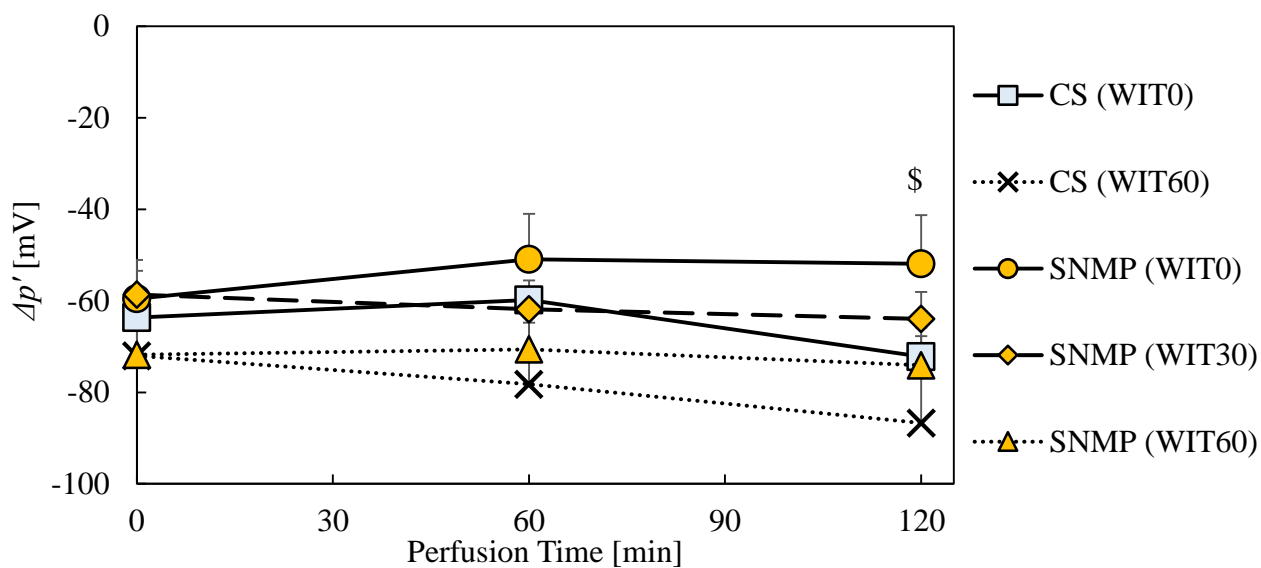


Fig.4.1.57 Proton index during SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT60) vs SNMP(WIT60), \$CS(WIT60) vs
SNMP(WIT60); $p < 0.05$

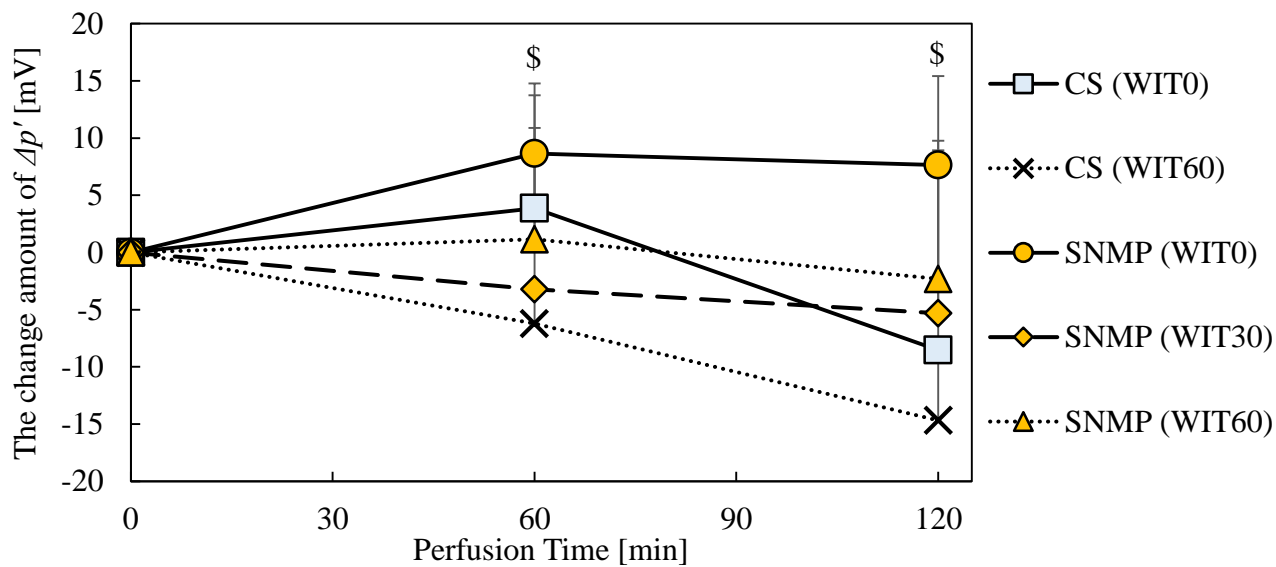


Fig.4.1.58 The change amount of proton index during IRM after CS or SNMP

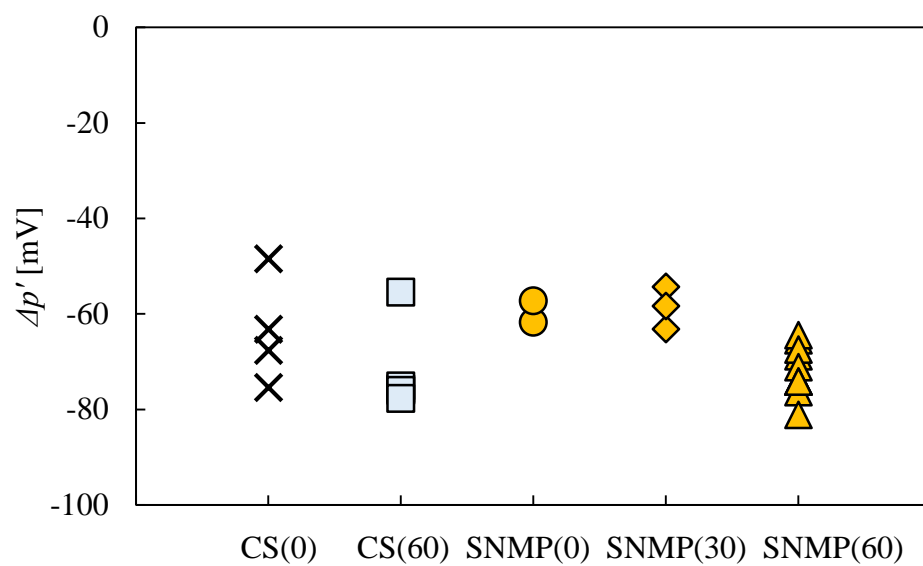


Fig.4.1.59 Proton index during IRM after CS or SNMP at 0min

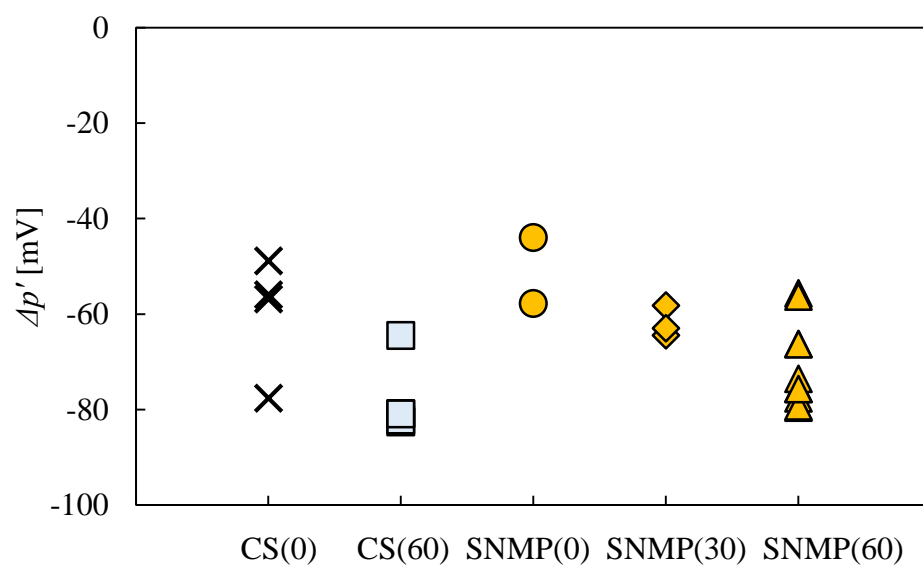


Fig.4.1.60 Proton index during IRM after CS or SNMP at 60min

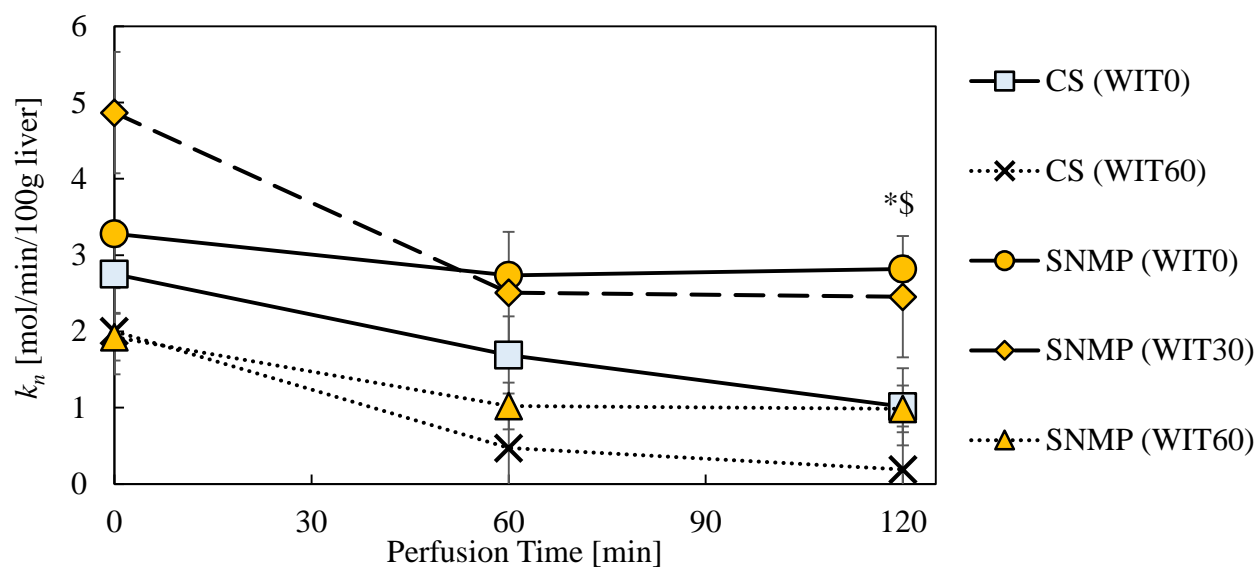


Fig.4.1.61 Metabolic index during IRM after CS or SNMP

*CS(WIT0) vs SNMP(WIT30), #CS(WIT60) vs SNMP(WIT60), \$CS(WIT60) vs
SNMP(WIT60); $p < 0.05$

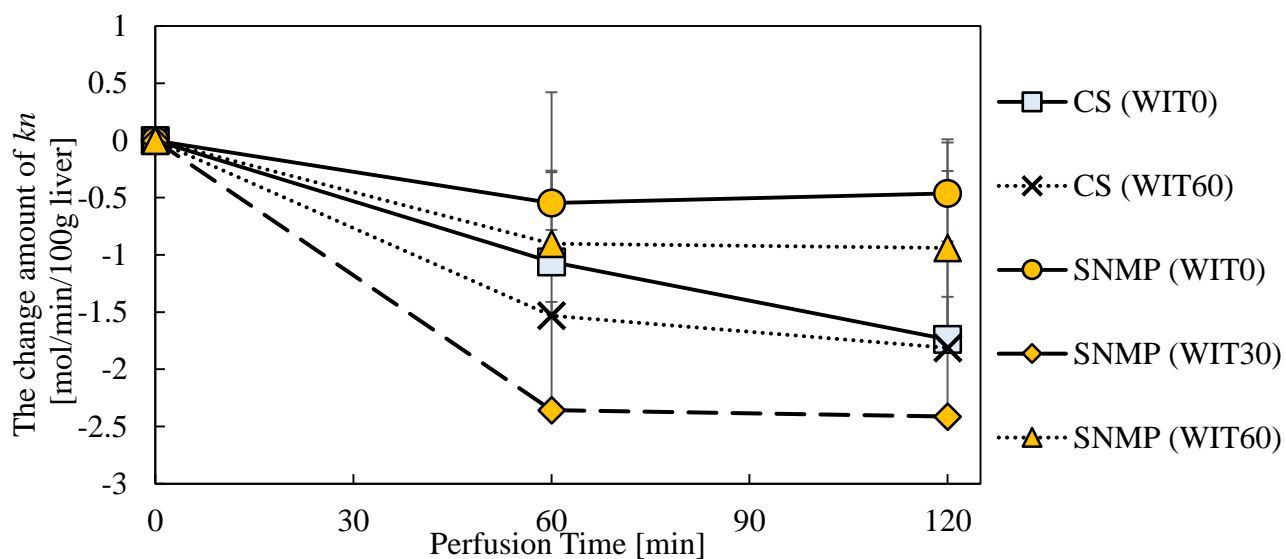


Fig.4.1.62 The change amount of Metabolic index during IRM

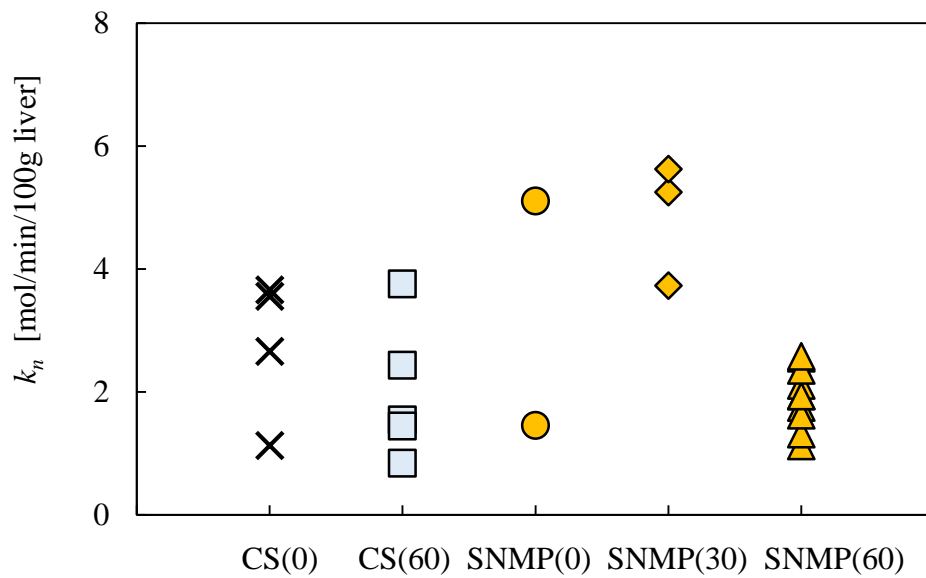


Fig.4.1.63 Metabolism index during IRM at 0min

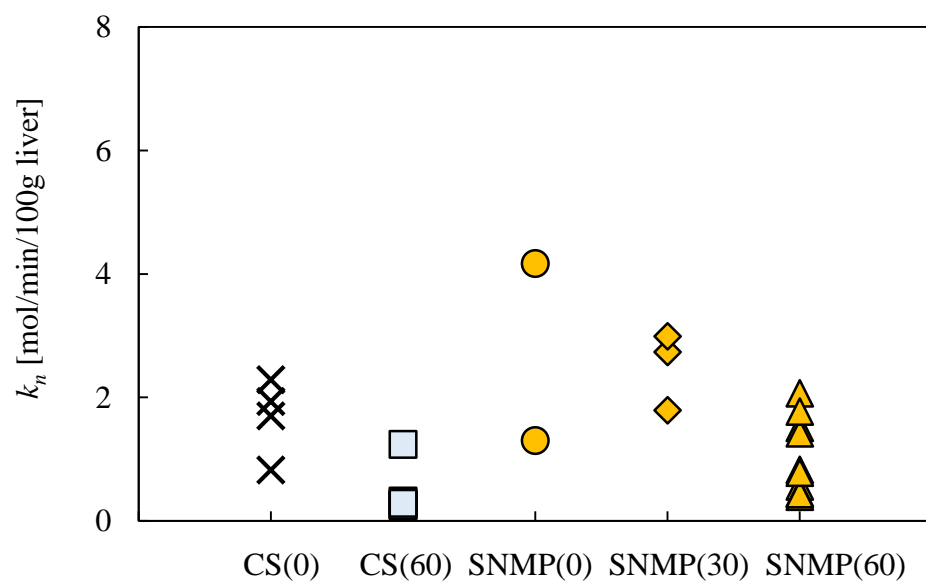


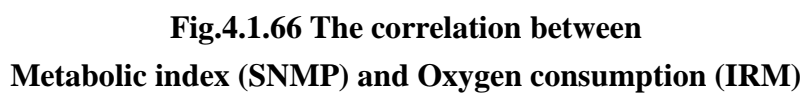
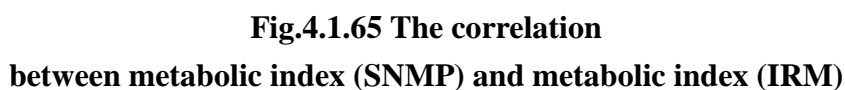
Fig.4.1.64 Metabolism index during IRM at 60min

4.1.7 室温灌流中代謝因子と体外血液再灌流モデル各種指標比較

心停止後臓器を始めとしたマージナルドナーの移植においては、安全な手技を確立するためにも定量的な移植前機能評価手法の確立が重要課題である。本実験では室温機械灌流法における代謝因子から算出した、肝臓代謝指数に注目した移植前機能評価法の検討を行うために、室温灌流 4 時間時点での肝臓代謝指数と再灌流中の各種指標を比較し、移植前機能評価法としての有用性を検討した。Fig.4.1.65 には再灌流 1 時間時点での肝臓代謝指数、Fig.4.1.66 には酸素消費量について、室温機械灌流 4 時間時点での肝臓代謝指数との相関を示した、肝臓代謝指数、および酸素消費量はともに有意に強い相関を示したことから、保存中の代謝機能と移植後の代謝機能は相互関係にあることが示唆された。Fig.4.1.67,68 には再灌流 1 時間時点での門脈圧力、および肝動脈における 1 時間の血管圧変化量との相関を示したが、統計的に有意な相関を示されなかったものの、肝動脈圧とは若干の相関を示した。肝動脈は、解剖学的には胆管と絡み合いながら並走し、心臓から流れる酸素を多く含んだ血液が流れ、肝臓への酸素供給の要となる血管であることから、その機能は代謝機能と密接に関連していると考えられており、保存中の代謝因子とも関連していることが予想される。Fig.4.1.69 には胆管機能の指標である逸脱酵素 ALP の再灌流 1 時間の流出量、Fig.4.1.70 には酸塩基平衡の指標である乳酸、Fig.4.1.71 には糖代謝の指標であるグルコースについて、それぞれ再灌流中における代謝にかかわる指標について相関を示した。これより、それぞれ灌流中の肝臓代謝因子と統計学的に有意に強い相関を示し、肝臓代謝指数による移植前の肝臓代謝機能の評価の可能性を示唆した。

前述のとおり、肝臓は非常に多様な要素によってその働きは成り立っている。今回は室温機械灌流における代謝因子に注目し、保存後の代謝機能に関連する

と考えられる指標，肝臓代謝指数や酸素消費量や肝動脈圧，ラクテートやグルメコースと相関を示したことから，これらの指標に関しては灌流中に予想が可能であると考えられる．一方で逸脱酵素 AST, LDH などの，肝機能指標とは相関を示さず，明らかに異なる原理による機能であることから，肝臓機能評価のためには，今後はより多面的な観点からの評価が必要であると考えられる．



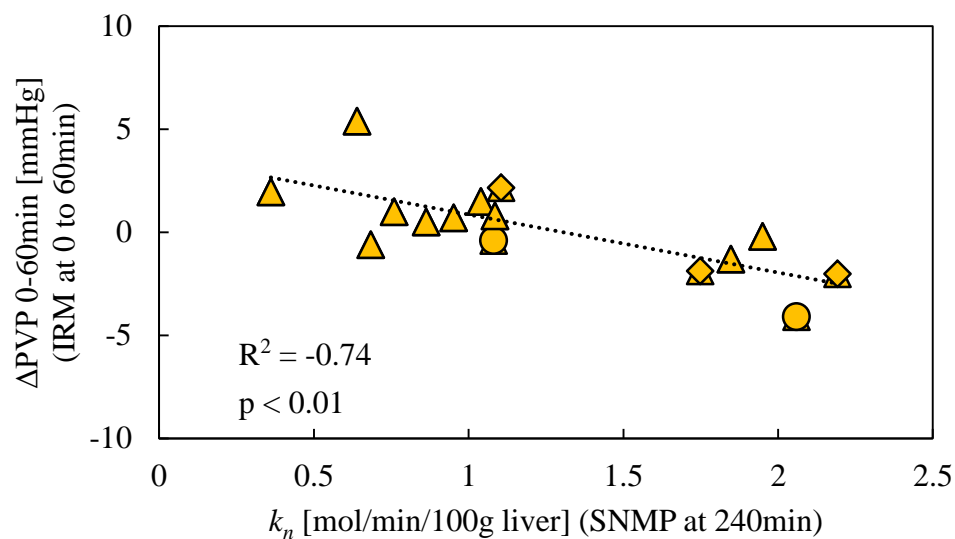


Fig.4.1.67 The correlation between Metabolic index (SNMP) and change amount of PVP of 0 to 60min (IRM)

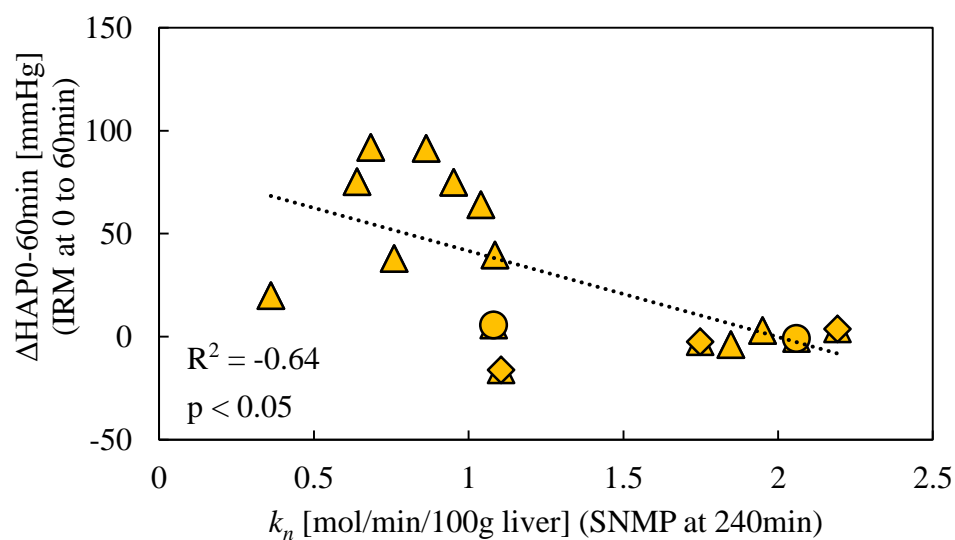
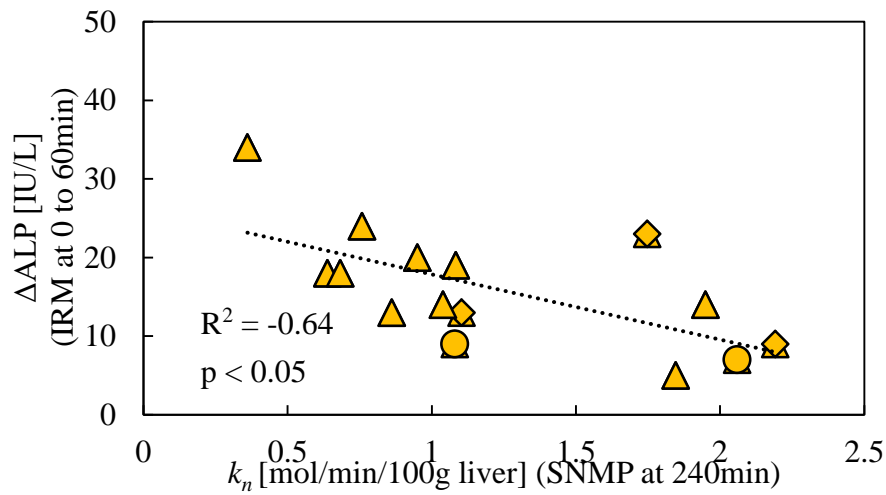
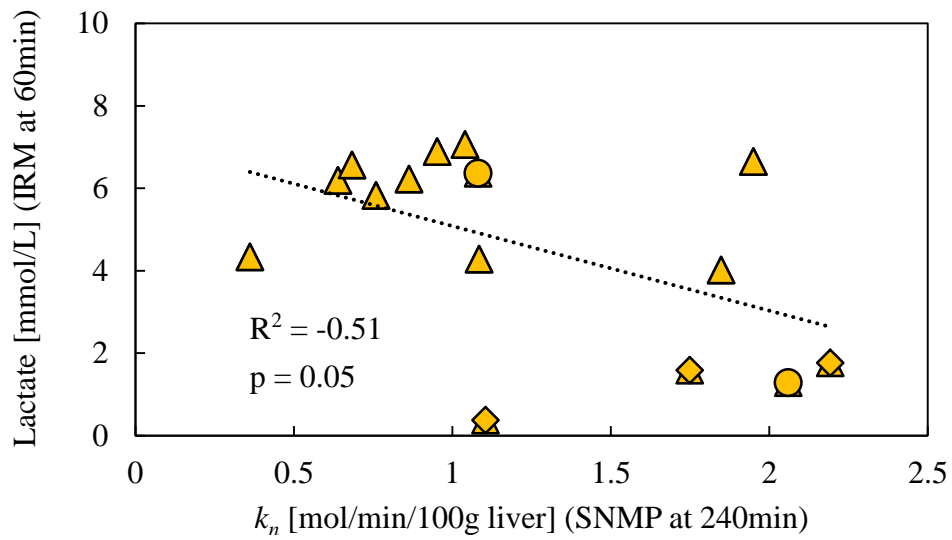


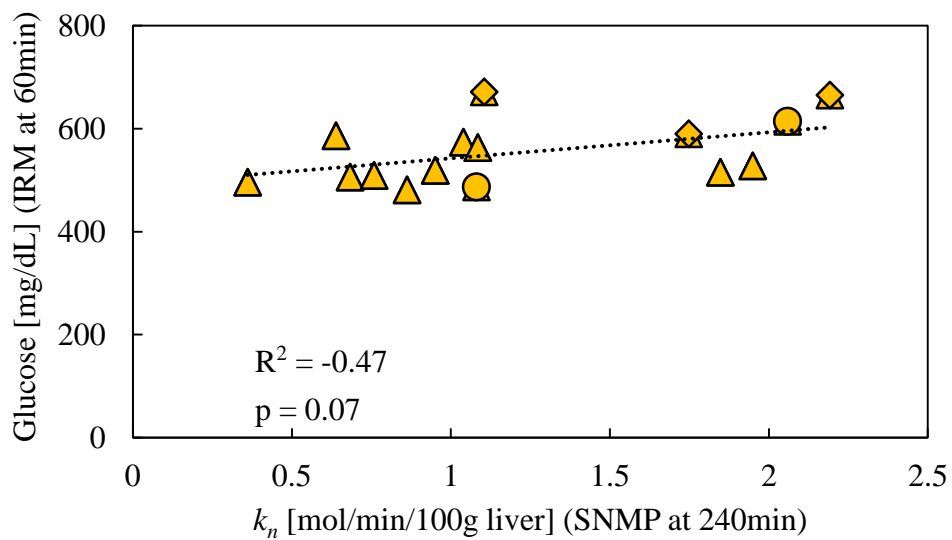
Fig.4.1.68 The correlation between Metabolic index (SNMP) and change amount of HAP pf 0 to 60 min (IRM)



**Fig.4.1.69 The correlation between
Metabolic index (SNMP) and release of ALP (IRM)**



**Fig.4.1.70 The correlation between
Metabolic index (SNMP) and release of ALP (IRM)**



**Fig.4.1.71 The correlation between
Metabolic index (SNMP) and lactate level (IRM)**

4.1.8 ICG 蛍光法による肝臓代謝評価

ICG 蛍光法は、灌流液に添加した ICG 粒子はそのほとんどが肝実質細胞による代謝を通じて胆管側に排出される特性を利用して、本研究では肝臓代謝機能の視覚的な評価指標として使用した。Fig.4.1.72 には SNMP(WIT0), Fig.4.1.73 には SNMP(WIT30)の条件で肝臓を摘出、保存を行ったのち、体外血液再灌流モデルにおいて ICG を投入後、蛍光観察画像を示した。さらに参考として、Fig.4.1.74 には WIT0 分で摘出後、4 時間の低温機械灌流法による保存を行った肝臓の、ICG による蛍光画像を示した。これらから、室温機械灌流法においては温阻血時間なしの条件においても明らかに蛍光はまばらで、代謝機能の低下が示された。一方で、低温機械灌流法においては傾向が一様であり、健全な代謝機能が維持されていることが予想される。Fig.4.1.75-77 には、Fig.4.1.72-74 に示した各条件における臓器表面の赤、オレンジ、緑、青線上の輝度値を示す。今回輝度値を算出するにあたり、評価する線は各葉の端から端まで、できるだけ中心付近を通るように設定した。そして、この結果から条件ごとに値の不安定性の尺度であるばらつき変数を算出した結果を、Fig.4.1.78, 79 に示した。ただし今回は統計学的に各葉での条件を統一するために、各葉での輝度値を測定する線の長さは一定条件として、ばらつき変数を算出した。これより統計学的な差は示されなかったが、SNMP(WIT30)、次いで SNMP(WIT0)においてばらつきは大きく、臓器表面の蛍光がまだらであり、代謝機能に障害を有することが示唆された。

この室温機械灌流群における代謝障害は、4.1.3 でも記した通り、灌流不全領域が受けた障害によるものであると予想され、今後は流体力学的な観点に着目した、より詳細な灌流条件の管理が重要である。

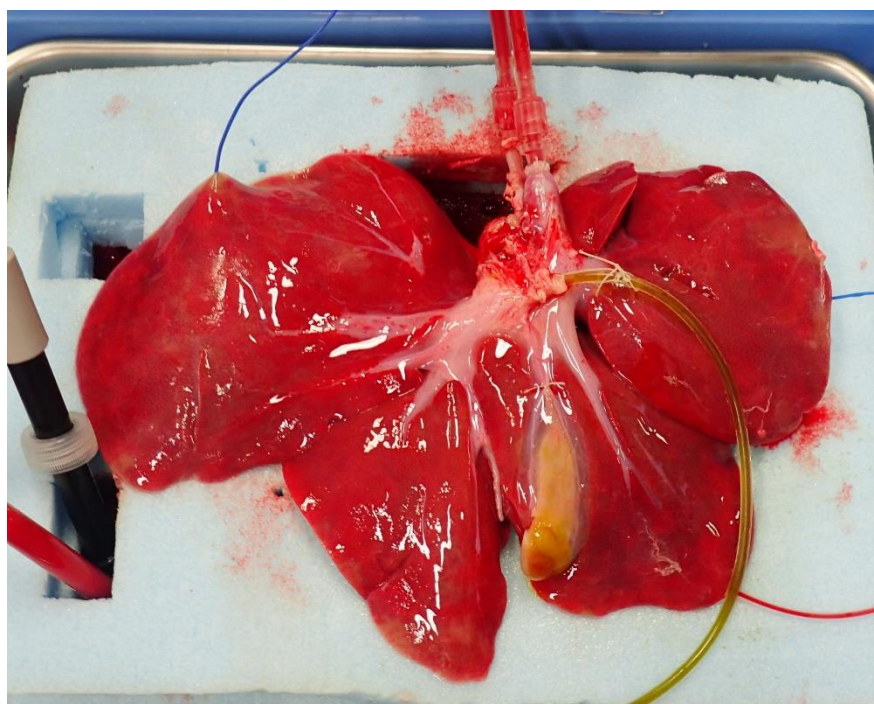
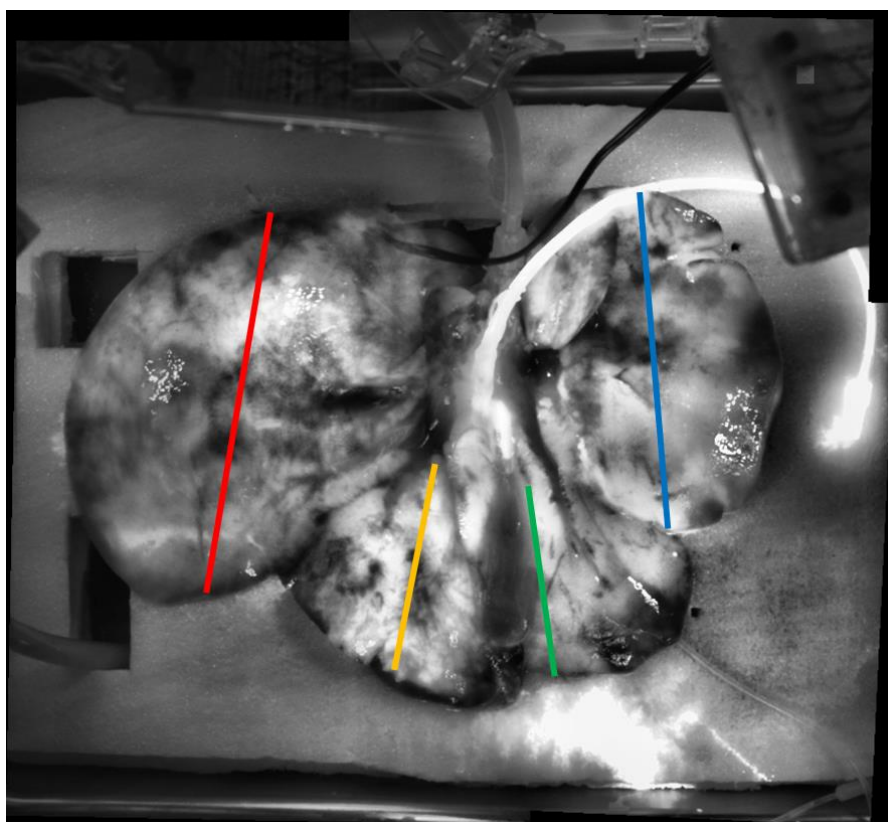


Fig.4.1.72 ICG fluorescence during IRM after SNMP with WIT 0 min

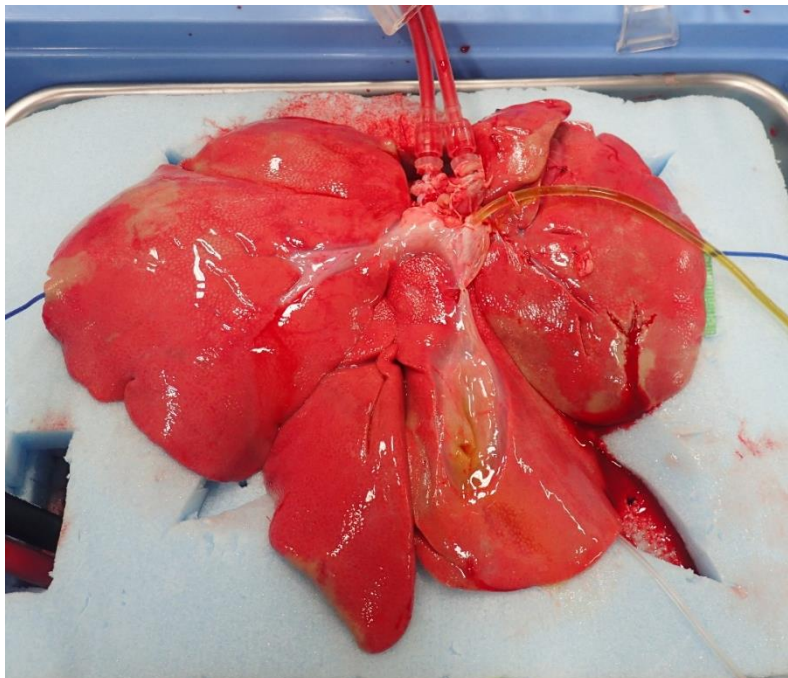
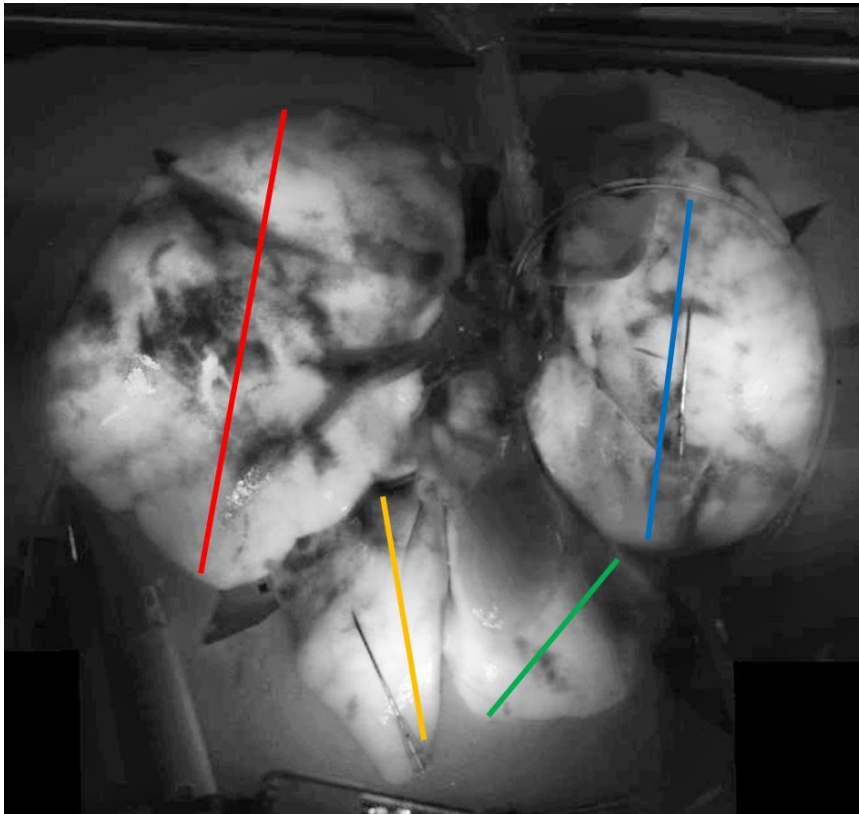


Fig.4.1.73 ICG fluorescence during IRM after SNMP with WIT 30 min

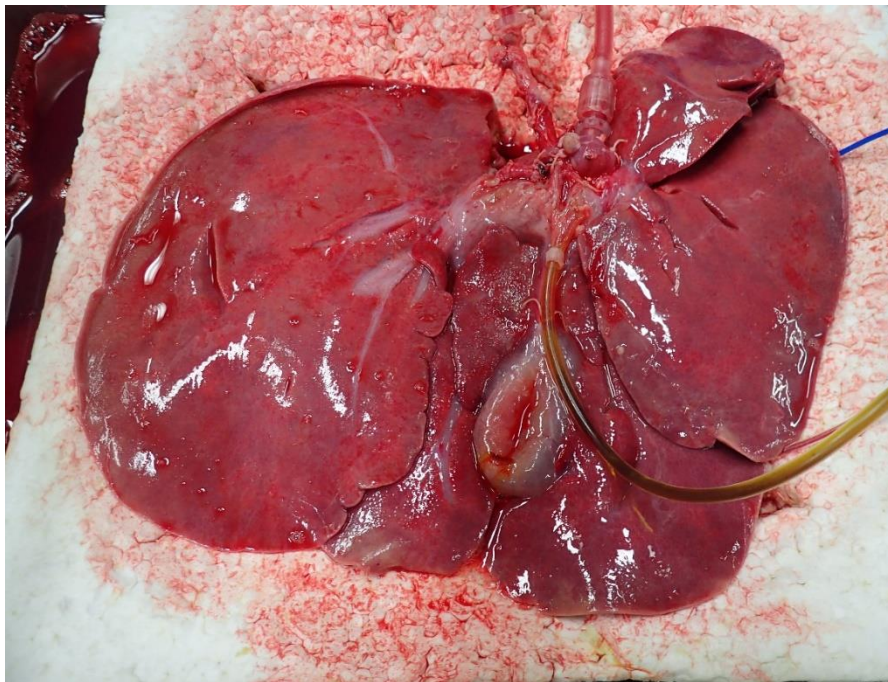
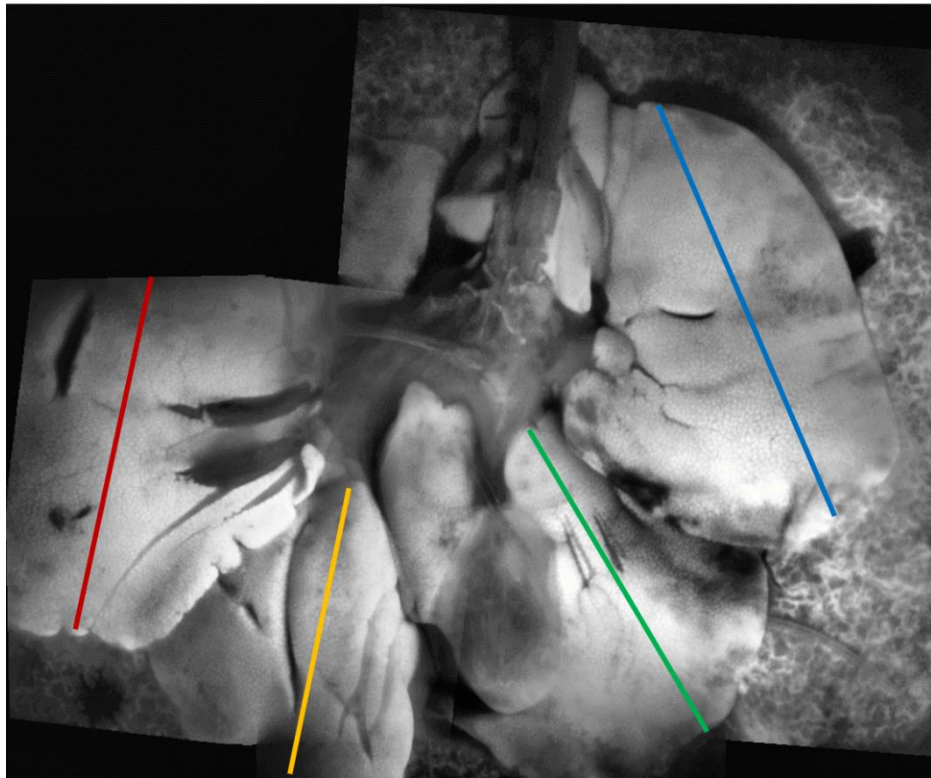


Fig.4.1.74 ICG fluorescence during IRM after HMP with WIT 0 min

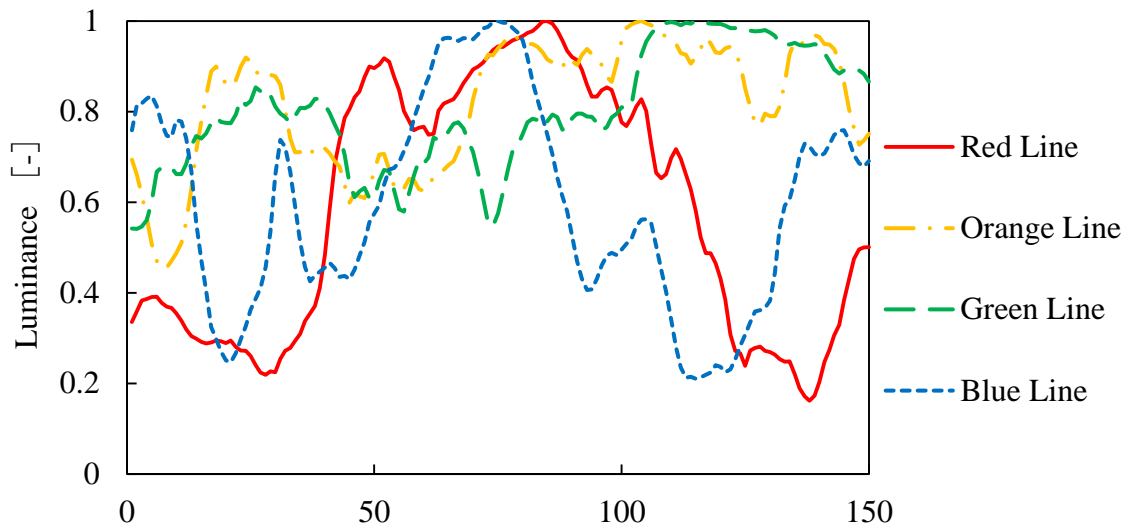


Fig.4.1.75 ICG fluorescence on the line during IRM after SNMP with WIT 0min

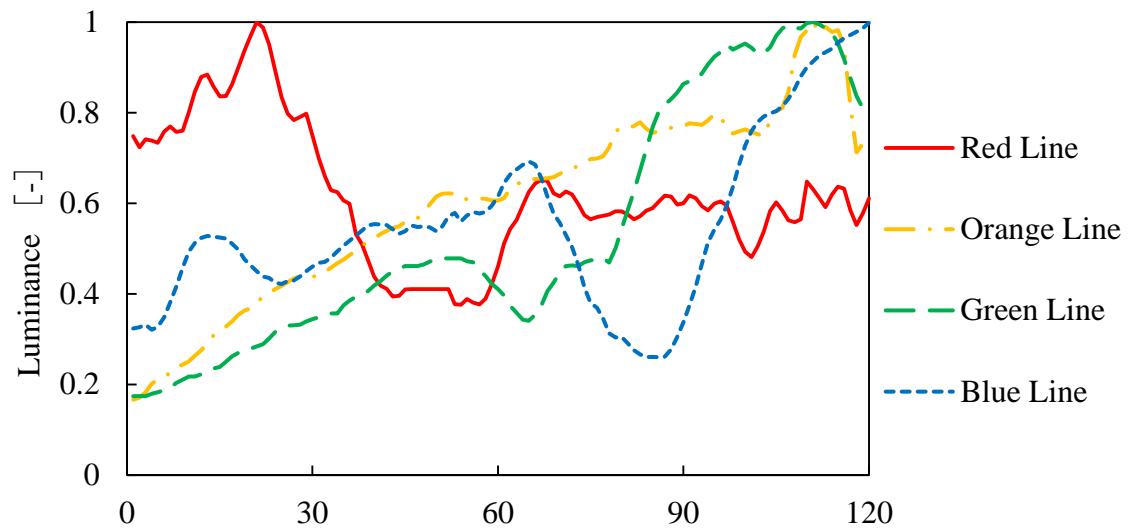


Fig.4.1.76 ICG fluorescence on the line during IRM after SNMP with WIT 30min

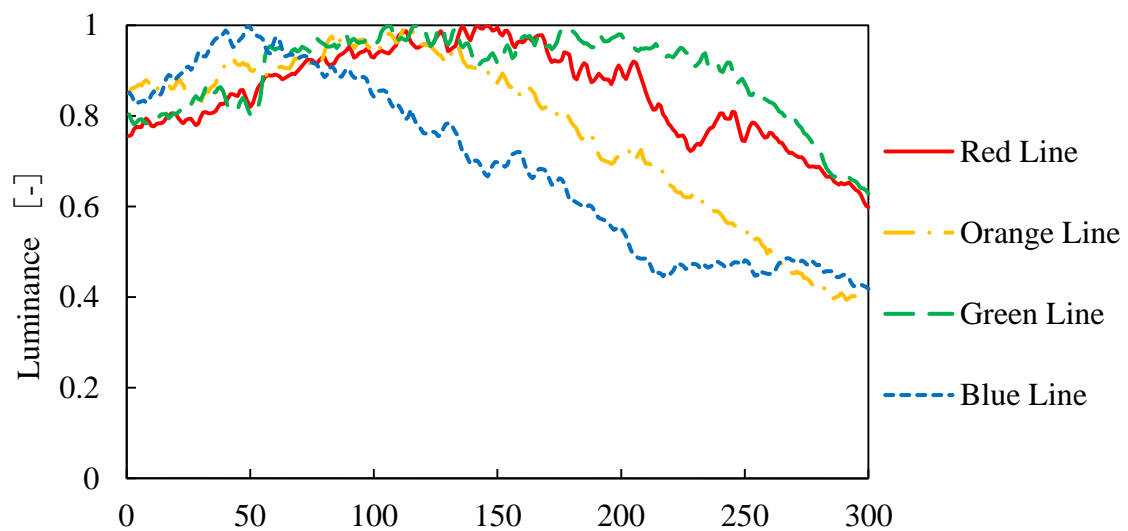


Fig.4.1.77 ICG fluorescence on the line during IRM after HMP with WIT 0min

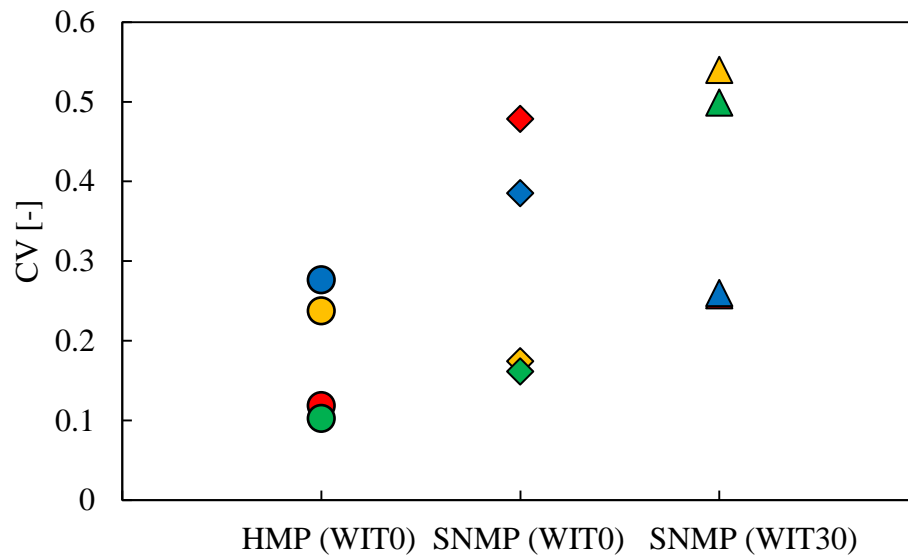


Fig.4.1.78 Coefficient of Variation of ICG fluorescence on the line during IRM

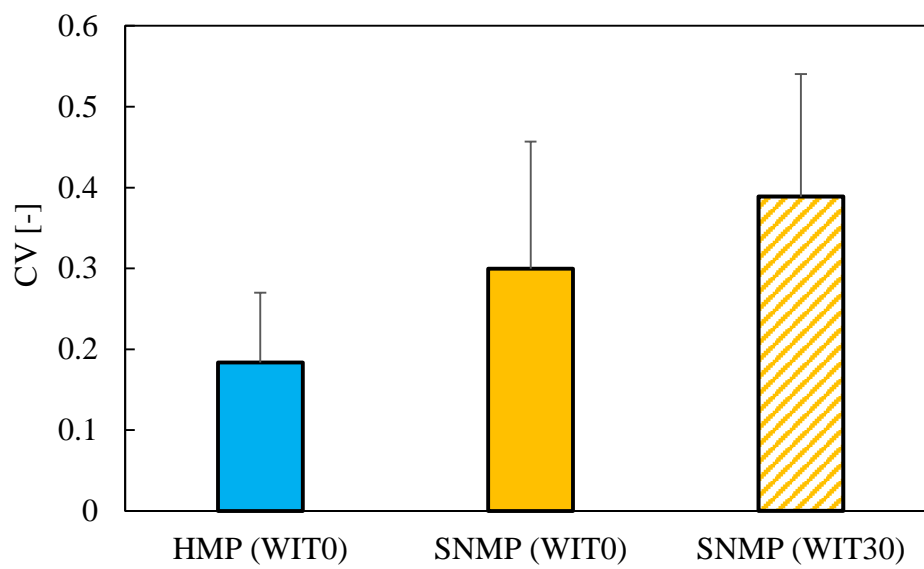


Fig.4.1.79 Coefficient of Variation of ICG fluorescence on the line during IRM

4.1.9 胆管圧測定による胆管流動と代謝機能評価

前述のとおり、近年では灌流中の評価手法として胆汁生成量、および胆汁成分分析が注目を集めているが、これは技術的に課題を有している。そこで、本実験では、胆管の圧力を測定することで胆汁生成および胆管流動の指標としての可能性を検討した。

Fig.4.1.80 には低温機械灌流、室温機械灌流、およびそれぞれ保存後の再灌流における胆管圧を示した。肝臓代謝機能は、温度に強く依存することが知られており、特に低温域においてはほとんど抑制されている。胆管圧は、灌流温度に比例して高値を示し、加えて同様の温度域では温阻血時間が長い実験群ほど低値を示した。

以上の結果から、その機能の傾向は十分に示すことができたと考えられるが、一方で今回の計測ではデータ数が少ないことや、測定には定期的に圧力抜きを行わないと胆管機能が閉塞してしまうこと、胆管は肝動脈と絡み合いながら流れていることで、肝動脈の圧力や拍動などの流動特性の影響を受けてしまうことなど課題は多く、評価手法の確立に向けて今後も議論が必要である。

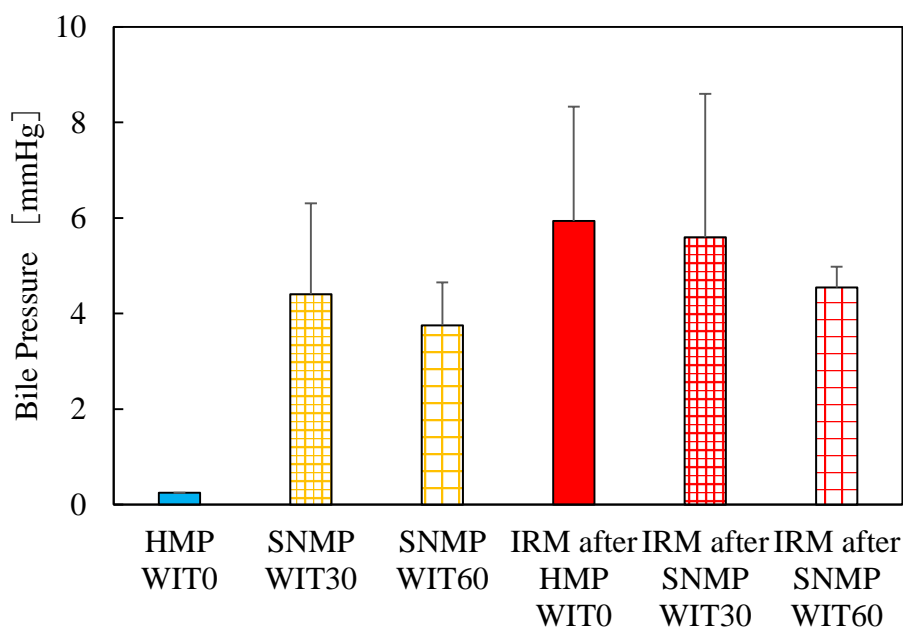


Fig.4.1.80 Bile duct pressure during HMP or SNMP or IRM

4.2 人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法

4.2.1 室温機械中の流動指標

4時間の室温機械灌流中に得られた灌流量，血管圧力，血管抵抗の流動指標を示す．Fig.4.2.1,2には，門脈，肝動脈それぞれの灌流流量を示した．実験条件に示した通り，灌流は一定流量の条件下で行った．

Fig.4.2.3, 4には門脈，肝動脈における血管圧力，Fig.4.2.5, 6には血管抵抗を示した．これより門脈，肝動脈ともに人工酸素運搬体の濃度の違いについて，ほぼ同程度の値を示し，統計学的な差は示されなかった．また，全ての群で肝動脈圧は灌流開始直後には再酸素化による再灌流障害や流量調整能の低下，微小血栓の形成によって高値を示したが，その後1時間程度で低値を示し，流動機能の改善を示唆した．

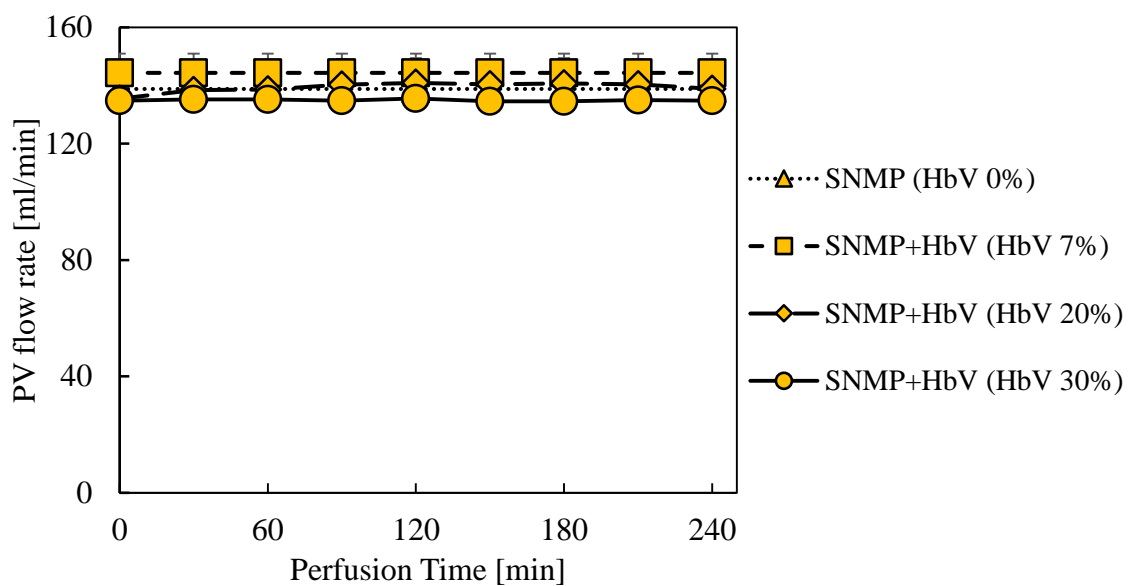


Fig.4.2.1 Flow rate of PV during SNMP

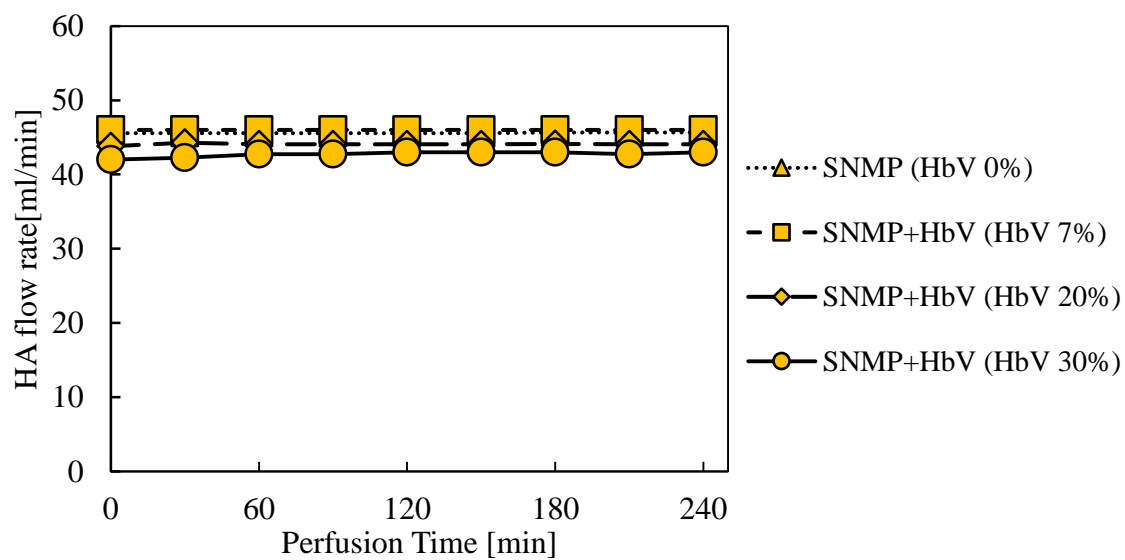


Fig.4.2.2 Flow rate of HA during SNMP

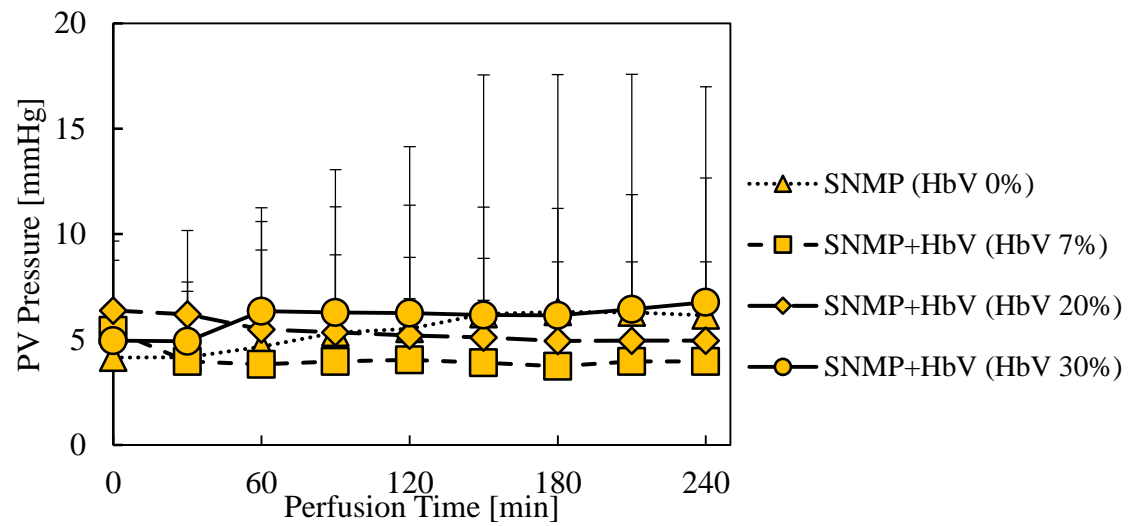


Fig.4.2.3 PV Pressure during SNMP

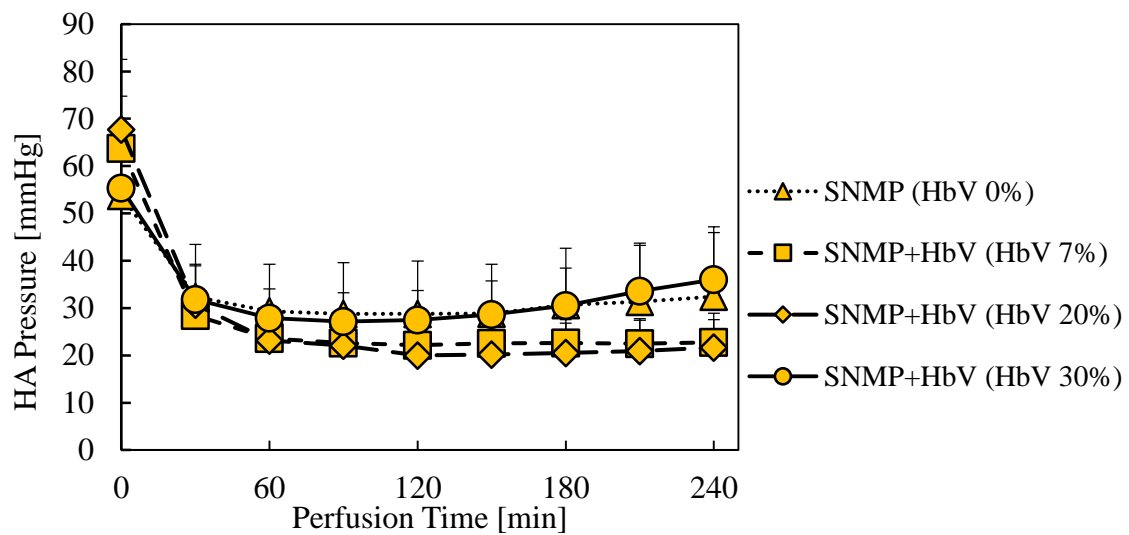


Fig.4.2.4 HA Pressure during SNMP

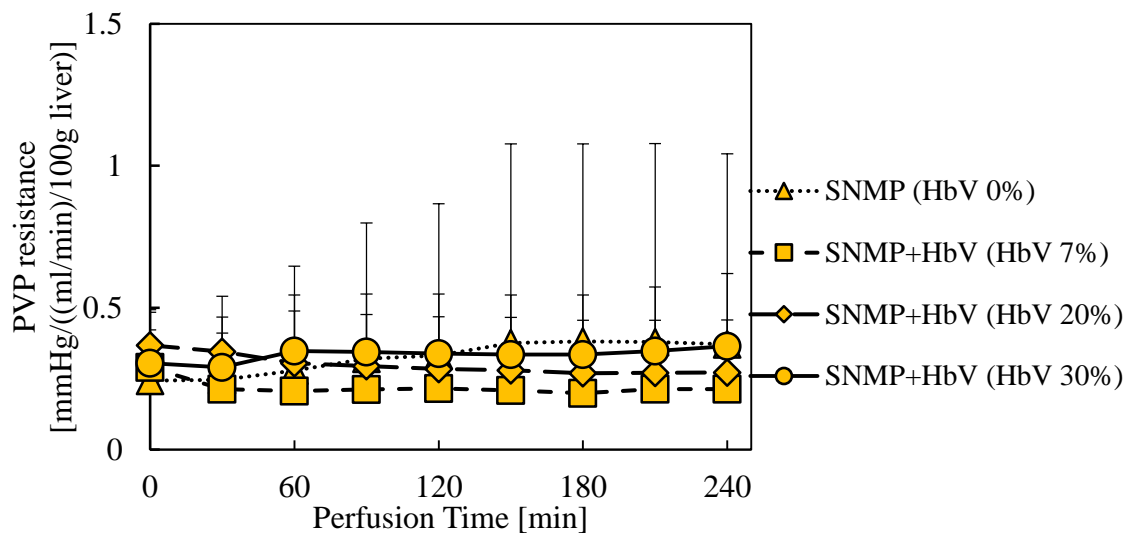


Fig.4.2.5 PVP Resistance during SNMP

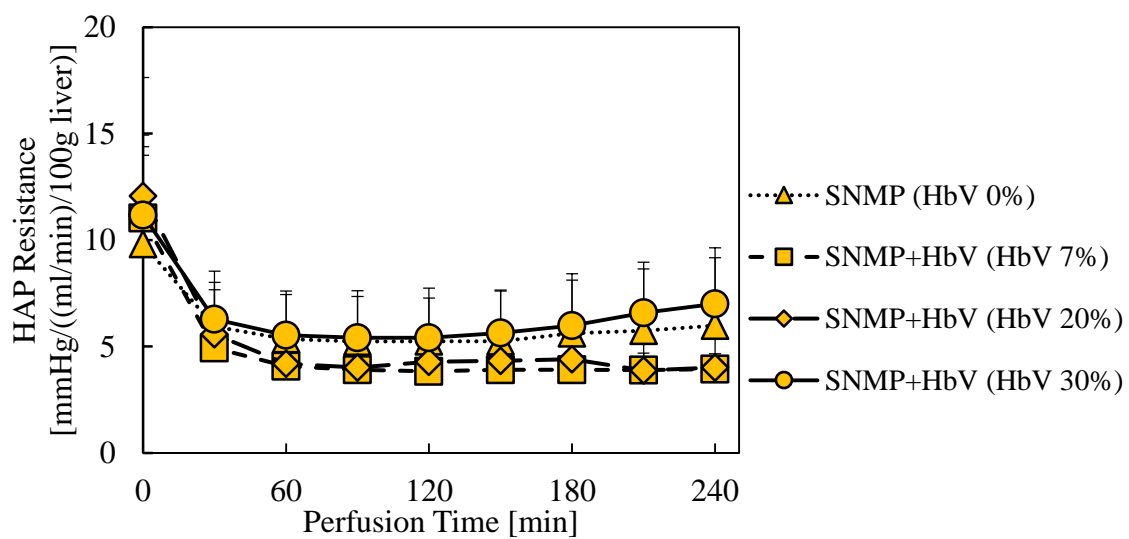


Fig.4.1.6 HAP Resistance during SNMP

4.2.2 室温灌流中の肝機能指標

4 時間の室温機械灌流中に得られた肝機能指標である逸脱酵素 AST, LDH の結果を示す. Fig4.2.7-12 には逸脱酵素 AST, および LDH の時間ごとの蓄積量, 灌流 1 時間ごとの流出量, 灌流 4 時間での総流出量をそれぞれ示した. 前述のとおり, 逸脱酵素は細胞が破壊されることで流出されることから, その流出量, つまり灌流液中の蓄積量が高値であるほど, 重度な肝機能障害を有していることが予想される. これより, 統計学的差はなかったが, SNMP with HbV(HbV20%)群で逸脱酵素蓄積量は最も低値を示した. 一方で, 逸脱酵素総流出量では SNMP with HbV(HbV20%)群, および SNMP with HbV(HbV30%)の人工酸素運搬体濃度が高い二群で高値を示し, 特に灌流初期の 1 時間の流出量が他群と比し顕著に高値を示した. 本実験では, 試料作成の都合上最も高濃度な SNMP with HbV(HbV30%)群では灌流液の総量が 1000ml と, 他群と比し 500ml 少なかったことから, 障害性の液性因子の濃度が増加したことも一つの要因になったと考えられる.

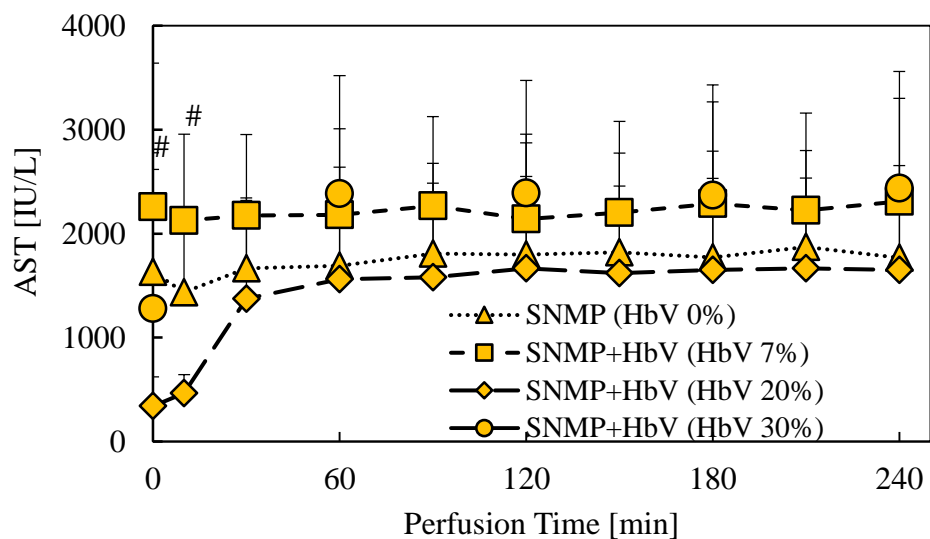


Fig.4.2.7 The amount of AST during SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%),
\$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

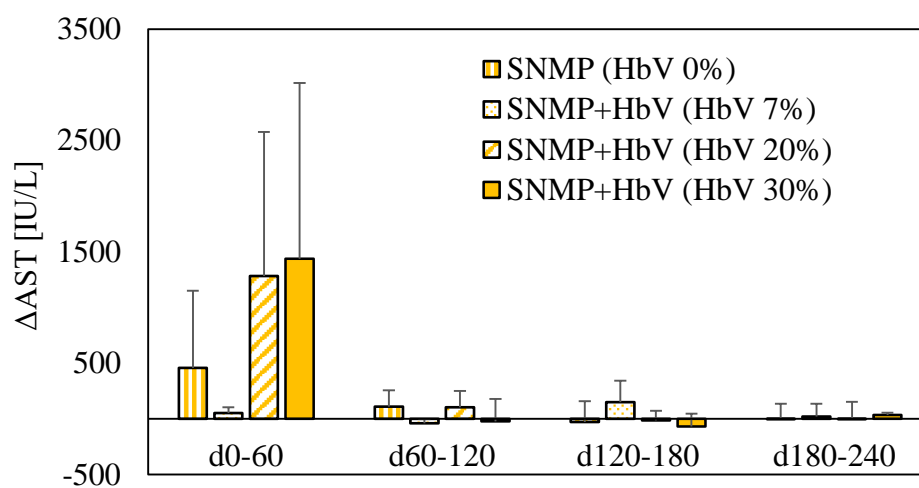


Fig.4.2.8 The release of AST during SNMP each 60min

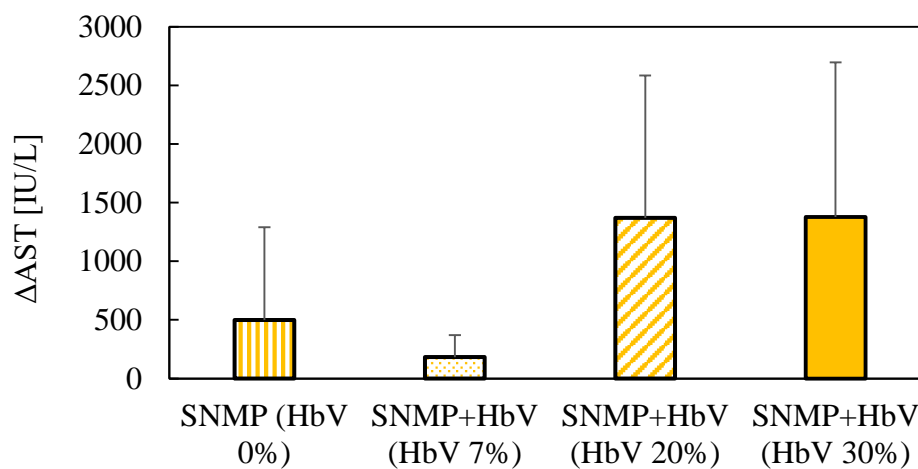


Fig.4.2.9 The release of AST during SNMP in 240 min

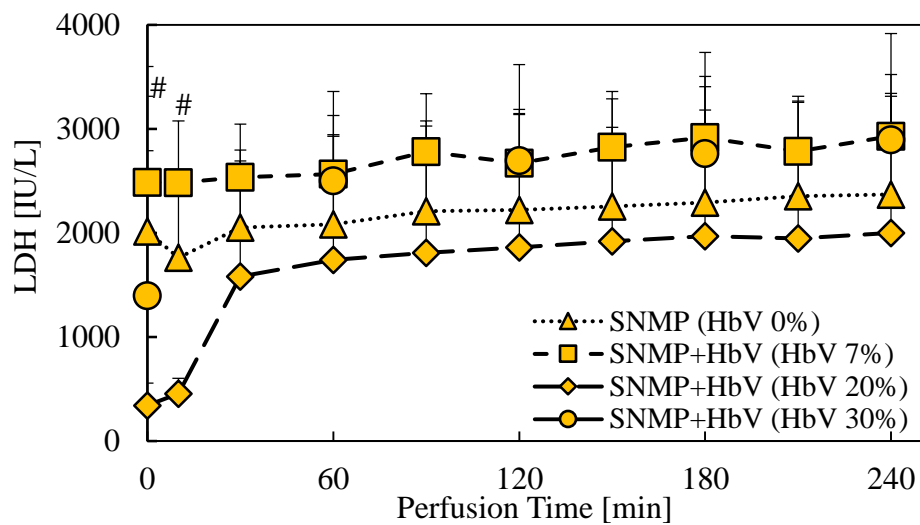


Fig.4.2.10 The amount of LDH during SNMP
 *SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

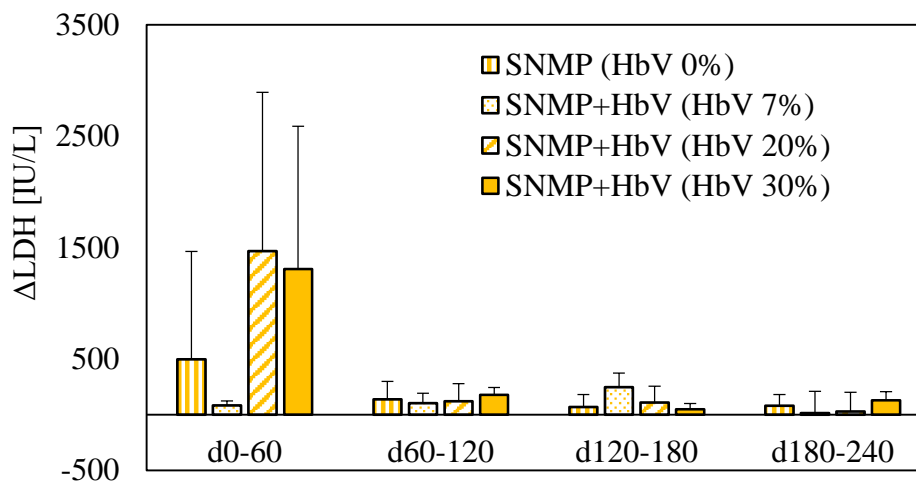


Fig.4.2.11 The release of LDH during SNMP each 60min

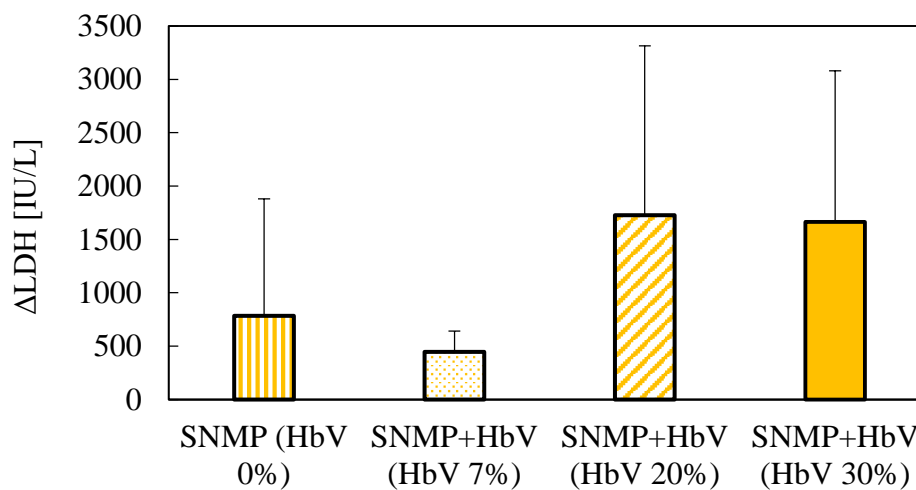


Fig.4.2.12 The release of LDH during SNMP in 240 min

4.2.3 室温灌流中の肝臓代謝因子

ここでは、室温機械灌流中の各種代謝因子について示す。Fig.4.2.13 には灌流中の酸素消費量、Fig.4.2.14 には灌流液の pH を示した。これより、酸素消費量には統計学的な差は示されなかったが、灌流液中の pH では他群が全体的にアシドーシスの傾向を示したのに対して、SNMP with HbV(20%)群では時間とともに基準値である 7.4 に向かう傾向となり、良好な代謝機能を示唆した。

Fig.4.2.15-18 には、ATP 合成における中間代謝の駆動力であるプロトン指数、およびその初期値からの変化量を示した。これより、統計学的な差はなかったが、人工酸素運搬体の濃度に比例してプロトン指数は高値を示し、相対的に良好な代謝機能を示した。特に、pH と同様に SNMP with HbV(20%)群は時間とともに上昇傾向を示し、活発な代謝機能による臓器再生を示唆した。

Fig.4.2.19-22 には、臓器全体での代謝機能を示す肝臓代謝指数、およびその初期値からの変化量を示した。これもプロトン指数同様に統計学的な差は示されなかったが、人工酸素運搬体が高濃度の二群において高値を維持し、灌流中の変化量でも上昇傾向を示したことから、人工酸素運搬体によるより積極的な酸素化を通じた代謝の活性が示され、それに伴う臓器機能再生が示唆された。

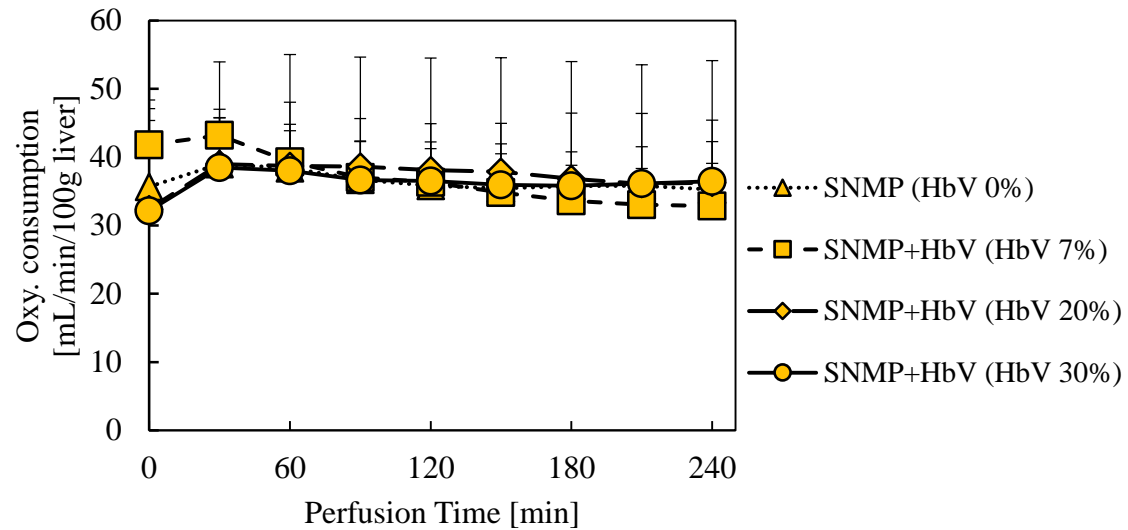


Fig.4.2.13 Oxy. Consumption during SNMP

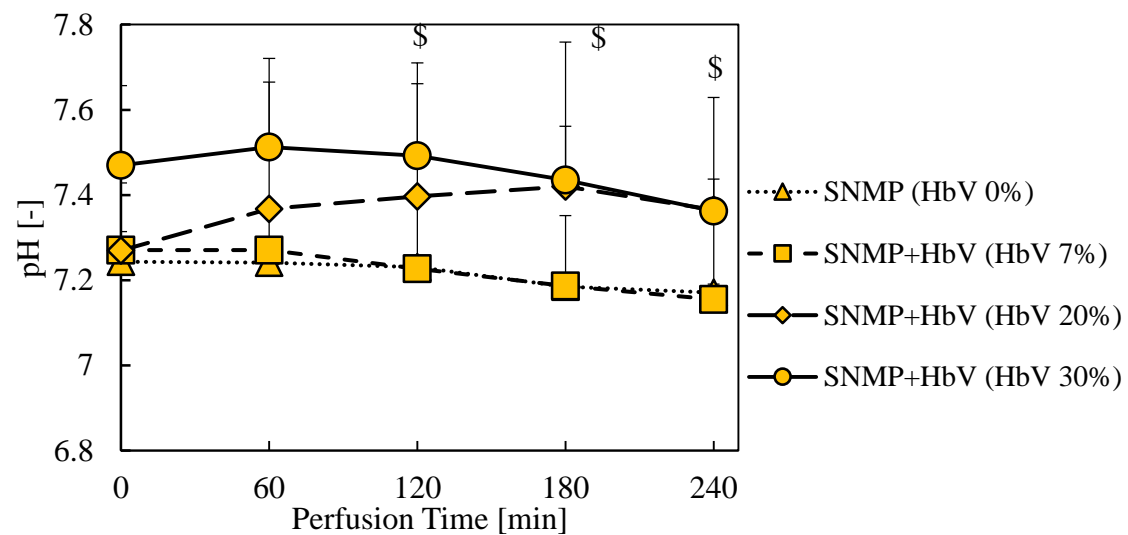


Fig.4.2.14 pH of perfusate during SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%),
\$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

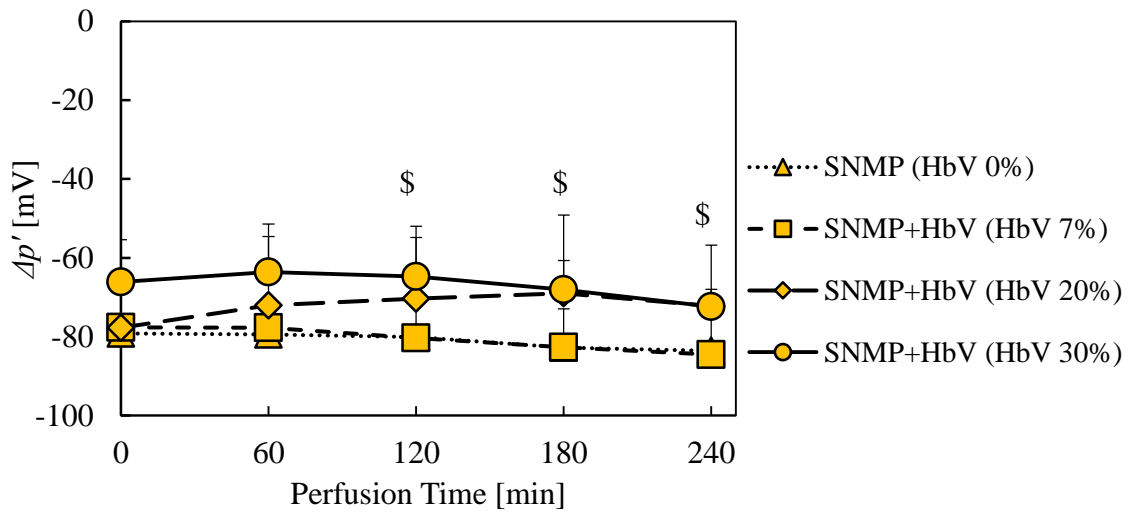


Fig.4.2.15 Proton index during SNMP

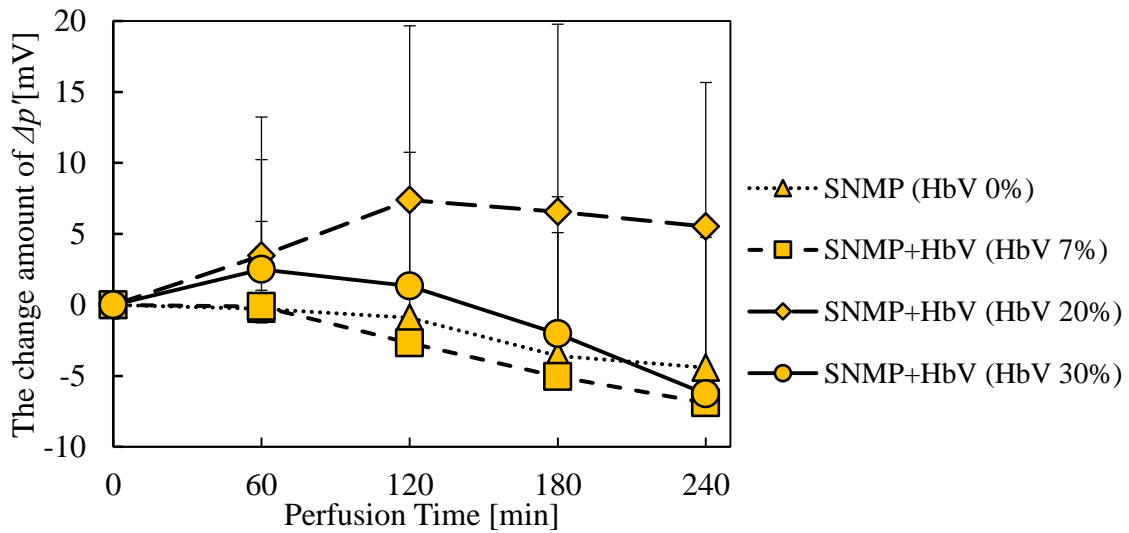


Fig.4.2.16 The change amount of proton index during SNMP

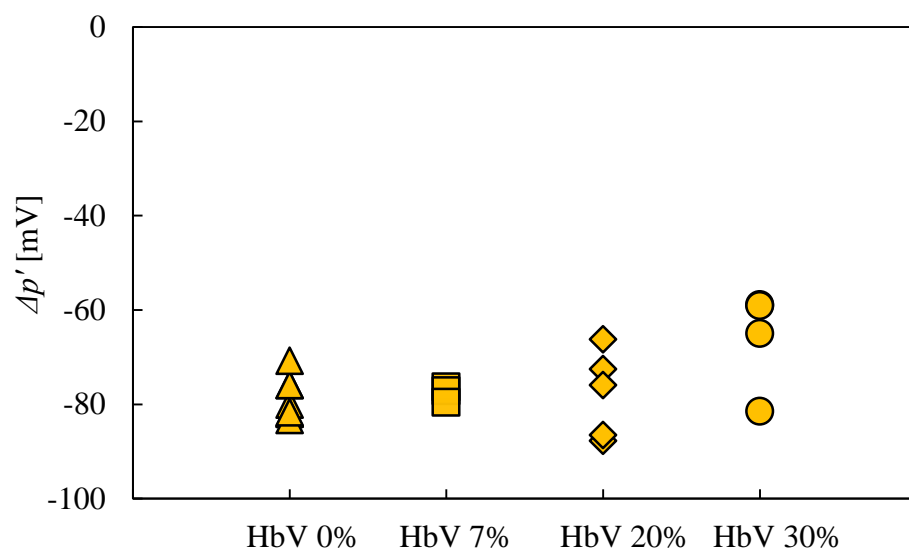


Fig.4.2.17 Proton index during SNMP at 0min

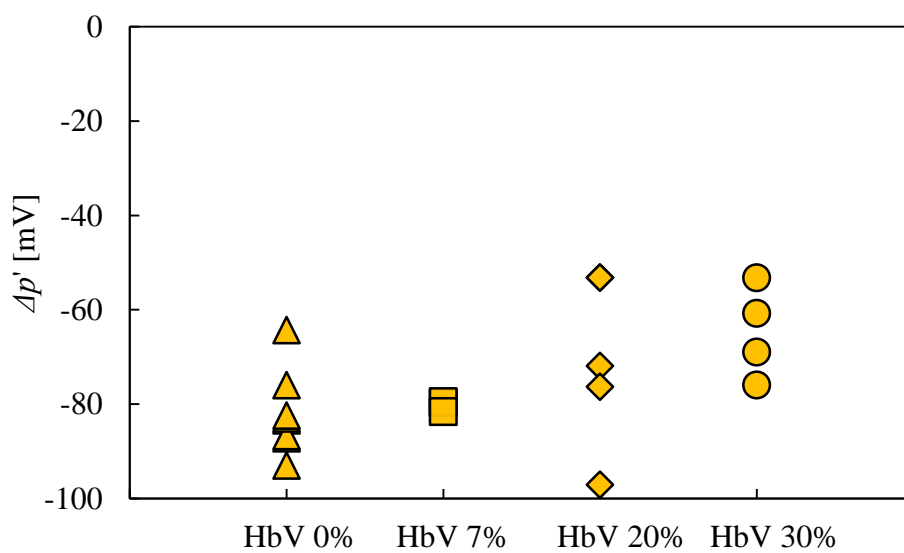


Fig.4.2.18 Proton index during SNMP at 240min

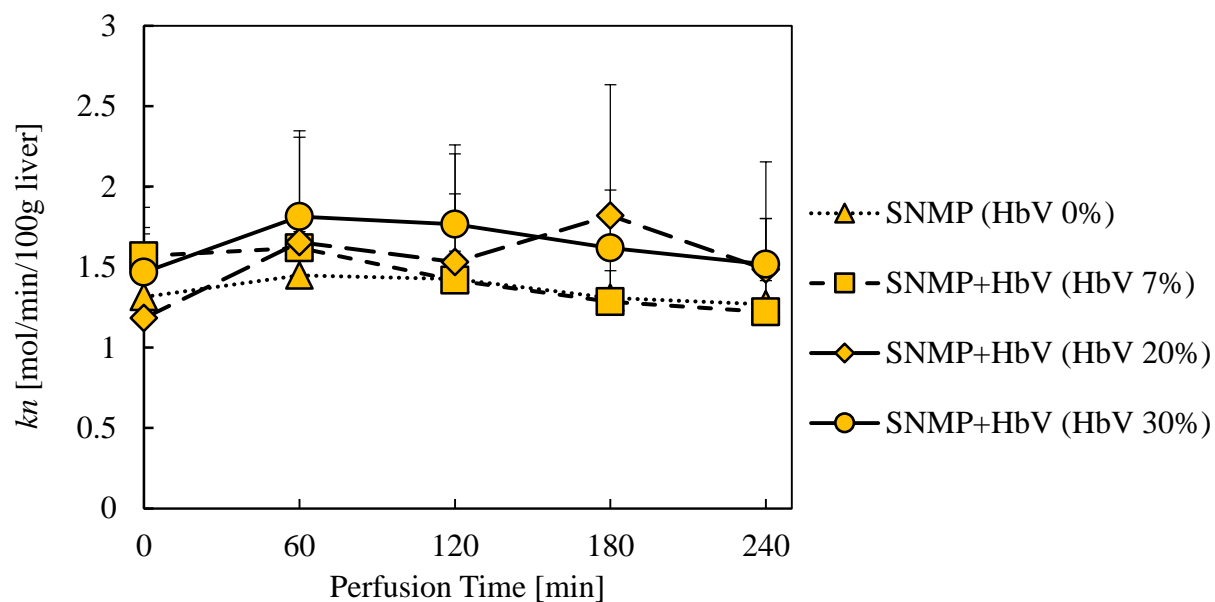


Fig.4.2.19 Metabolism index during SNMP

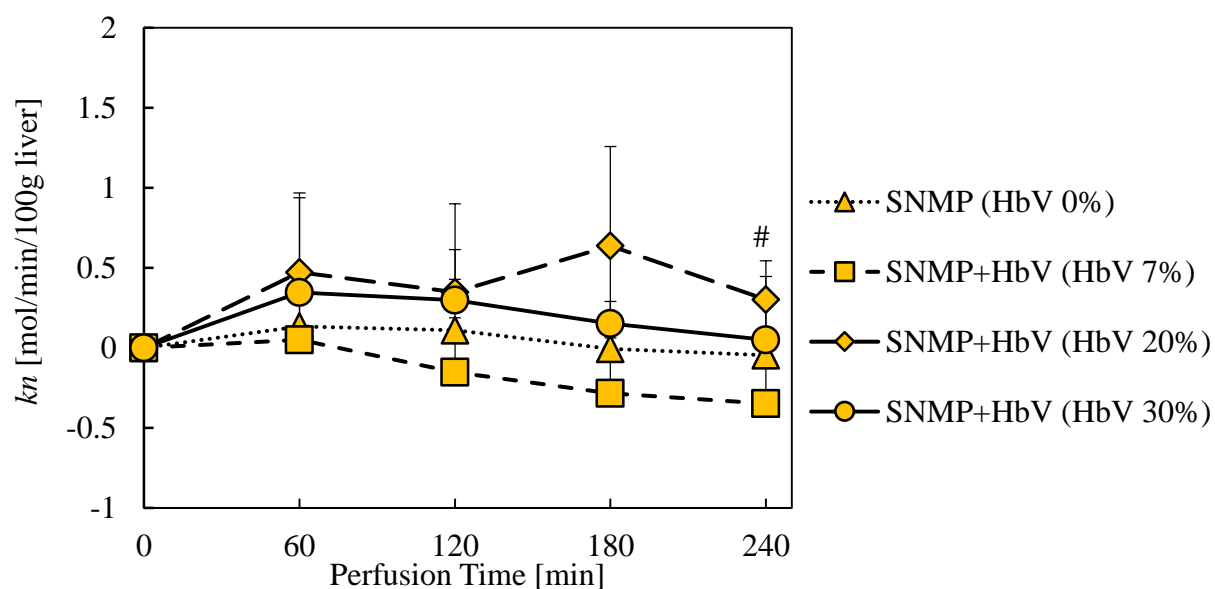


Fig.4.2.20 The change amount of Metabolism index during SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs
SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

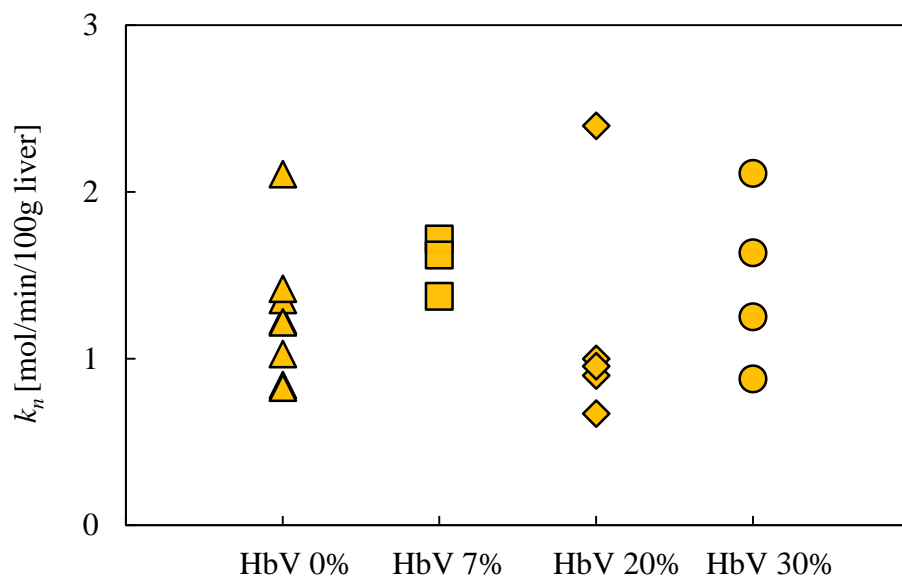


Fig.4.2.21 Metabolism index during SNMP at 0min

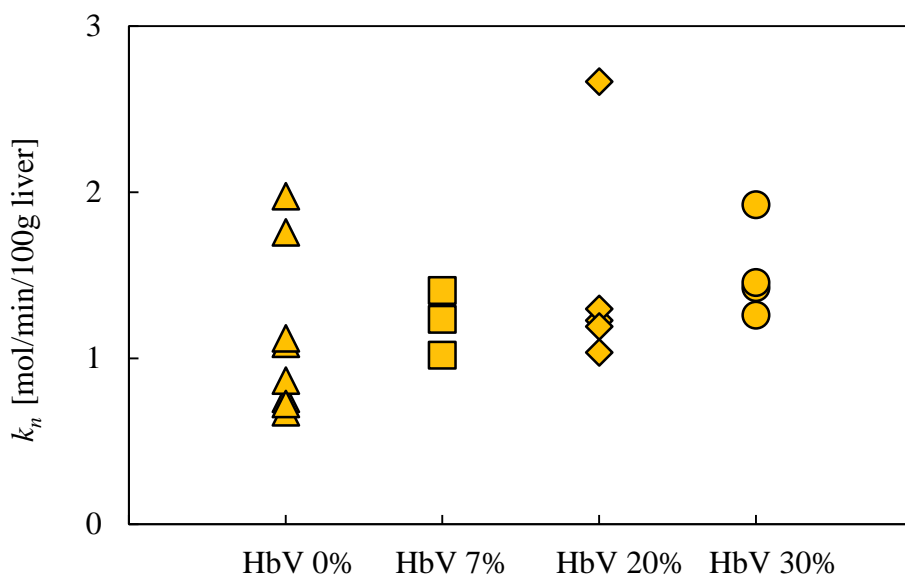


Fig.4.2.22 Metabolism index during SNMP at 240min

4.2.4 体外血液再灌流モデルによる流動指標

2時間の体外血液再灌流モデル実験による灌流量，血管圧力，血管抵抗の流動指標を示す．Fig.4.2.23, 24 には，門脈，肝動脈それぞれの灌流流量を示した．灌流流量については，保存時と同様に基本的には一定の値で行ったが，一部実験において肝動脈圧が極端に上昇したことから，圧力の上昇を抑制するために適宜調整を行った．

Fig.4.2.25-28 には，門脈，肝動脈圧それぞれの血管圧力，血管抵抗を示した．門脈においては従来 of 保存液による実験群，つまり人工酸素運搬体を添加しなかった群において最も低値を維持した．肝動脈においても，同様の傾向を示し，人工酸素運搬体が高濃度の二群では統計学的な差は示されなかったが，やや高値を示し，再灌流開始直後の急激な圧上昇も示された．加えて人工酸素運搬体添加群の一部においては，肝動脈圧において極端な圧力上昇が示された．人工酸素運搬体は，灌流前に微小血管に詰まる大きさの，クラスター化したものはフィルターを通すことで取り除いてから用いているので，物理的なつまりによるものではないことは明らかである．しかしながら臨床応用に向けては重大な問題であることから，今後原因究明が必要不可欠であるといえる．

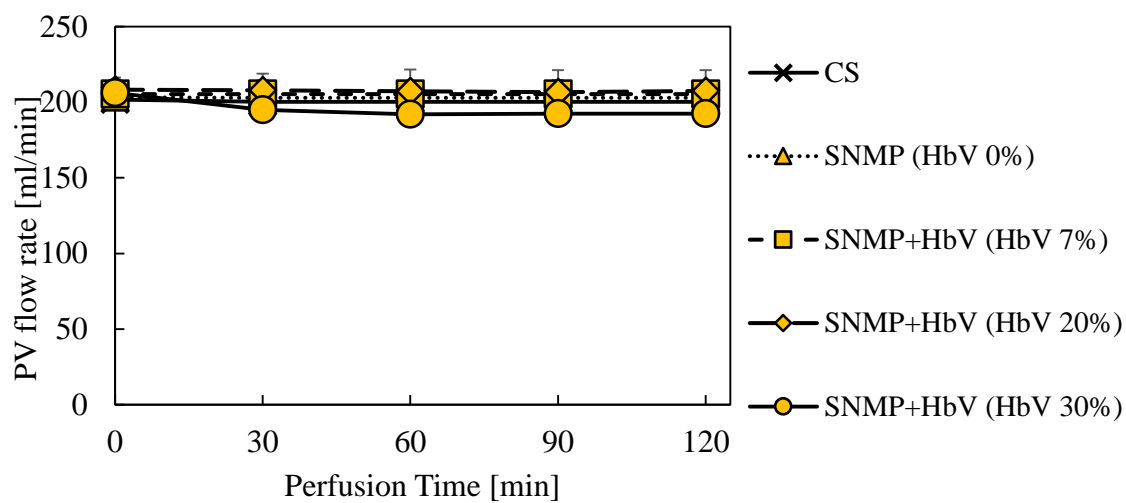


Fig.4.2.23 Flow rate of PV during IRM after CS or SNMP

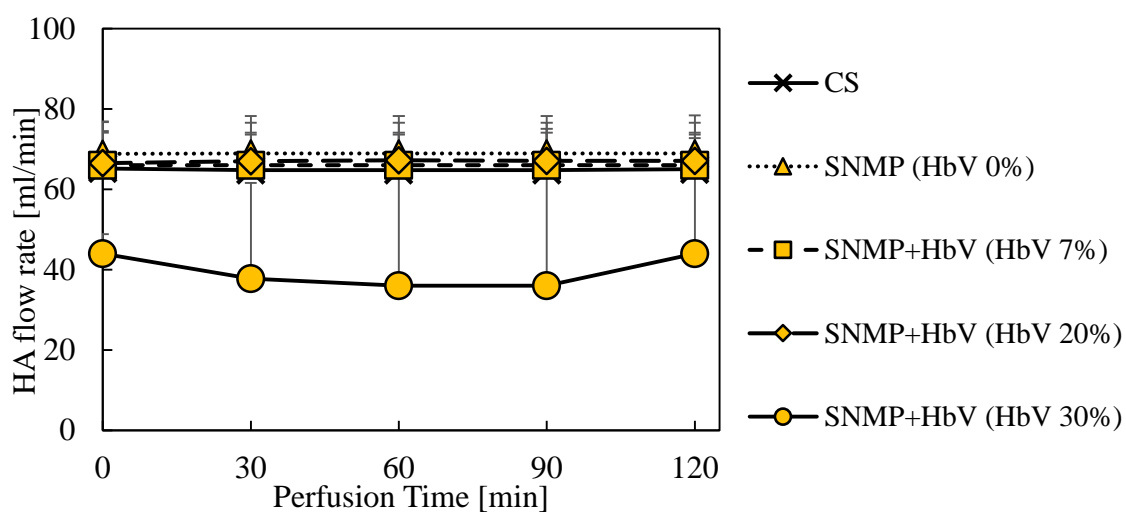


Fig.4.2.24 Flow rate of HA during IRM after CS or SNMP

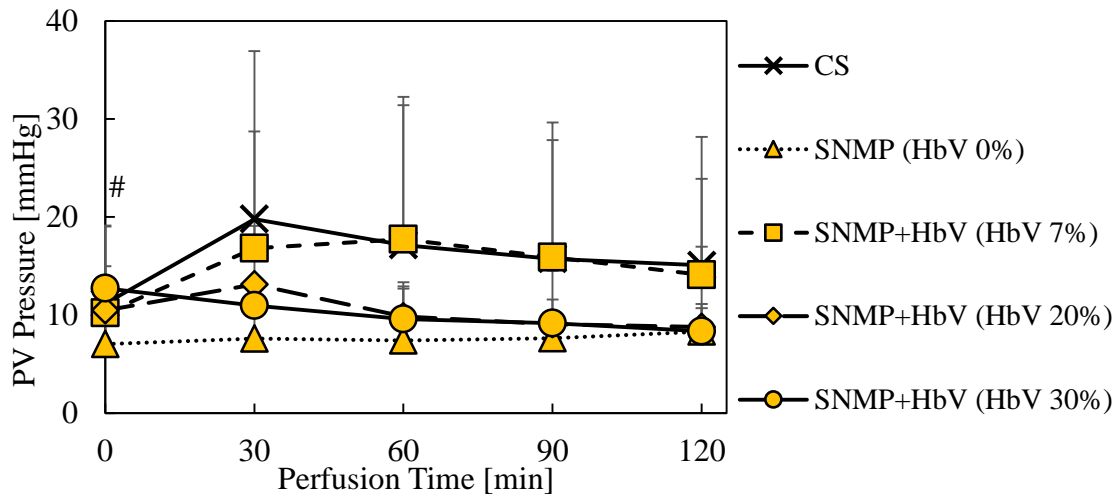


Fig.4.2.25 PV Pressure during IRM after CS or SNMP
 *SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs
 SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

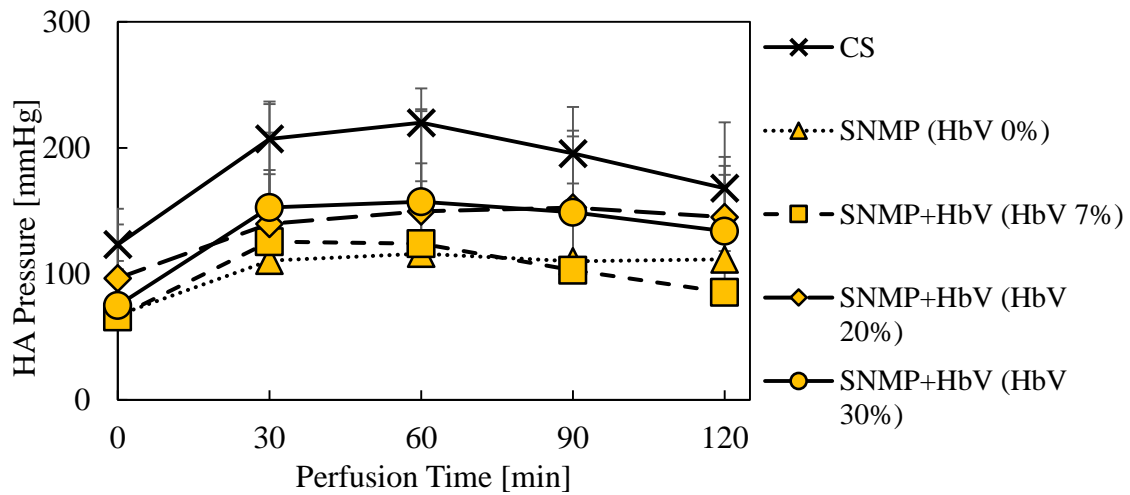


Fig.4.2.26 HA Pressure during IRM after CS or SNMP

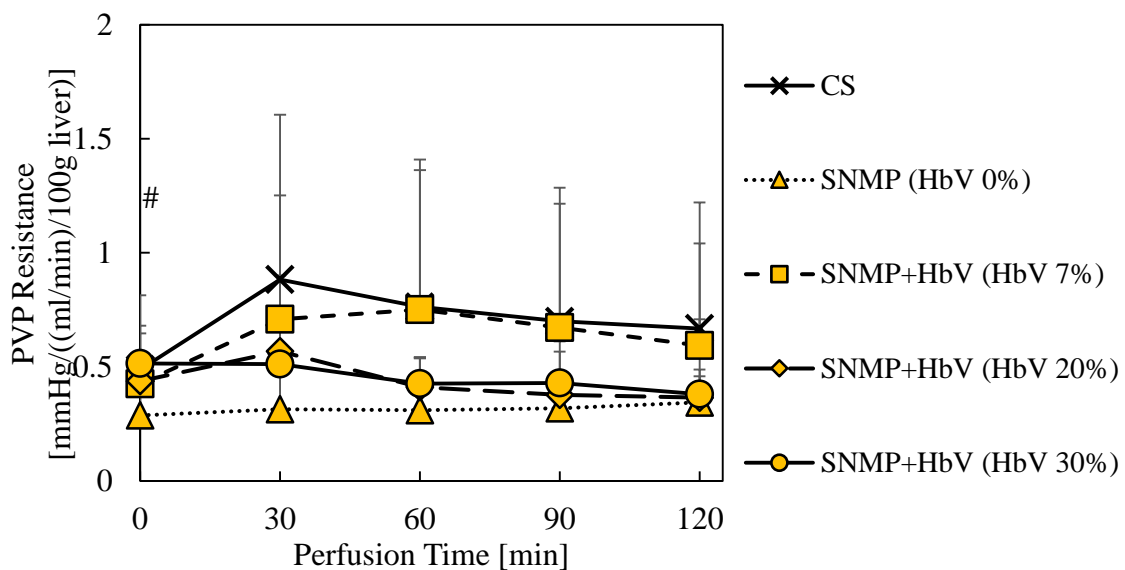


Fig.4.2.27 PVP Resistance during IRM after CS or SNMP
 *SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs
 SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

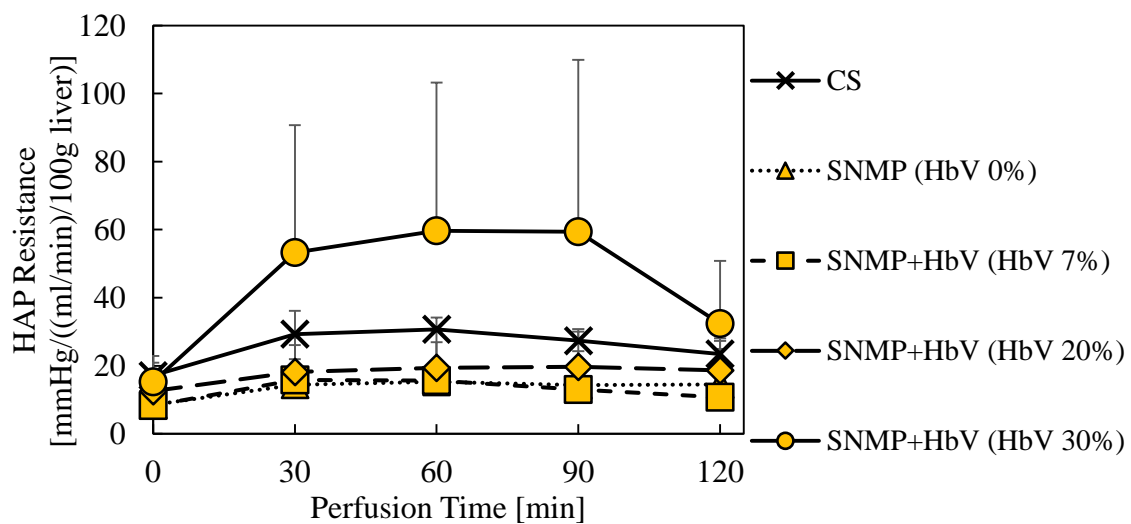


Fig.4.2.28 HAP Resistance during IRM after CS or SNMP

4.2.5 体外血液再灌流モデルによる肝機能指標

体外血液再灌流モデル実験による肝機能指標である各種逸脱酵素，および血液ガス分析によるバイオマーカーの測定結果を示す．Fig.4.2.29-32 には肝機能指標である逸脱酵素 AST，および LDH の時間ごとの蓄積量，再灌流 2 時間での総流出量をそれぞれ示した．これより，SNMP(HbV0%)群と比し，SNMP with HbV(HbV20%)群においては統計学的に低値を示し，良好な肝機能を示した．一方で AST，LDH の再灌流 2 時間での総流出量においては統計学的な差は示されなかったが，人工酸素運搬体が高濃度の二群においては単純冷却保存群と同程度の値を示し，きわめて厳しい肝機能であることが示唆された．また，Fig.4.2.33 には胆管障害の指標である ALP 流出量，Fig.4.2.34 では血管内皮障害の指標であるヒアルロン酸流出量を示した．ALP 流出量については，SNMP with HbV(20%)群において極端に高値を示し，重度な胆管障害が示され，ヒアルロン酸流出量においても，人工酸素運搬体が高濃度の群においてやや高値を示した．加えて Fig.4.2.35, 36 に示した乳酸，グルコースにおいても，それぞれ人工酸素運搬体添加群は SNMP(HbV0%)群と同等以下の結果を示し，重度な代謝障害が示唆された．以上の結果から，各種指標で人工酸素運搬体添加群では従来の保存液と比し良好な結果とはいえず，むしろ厳しい臓器機能を有していることが示唆された．

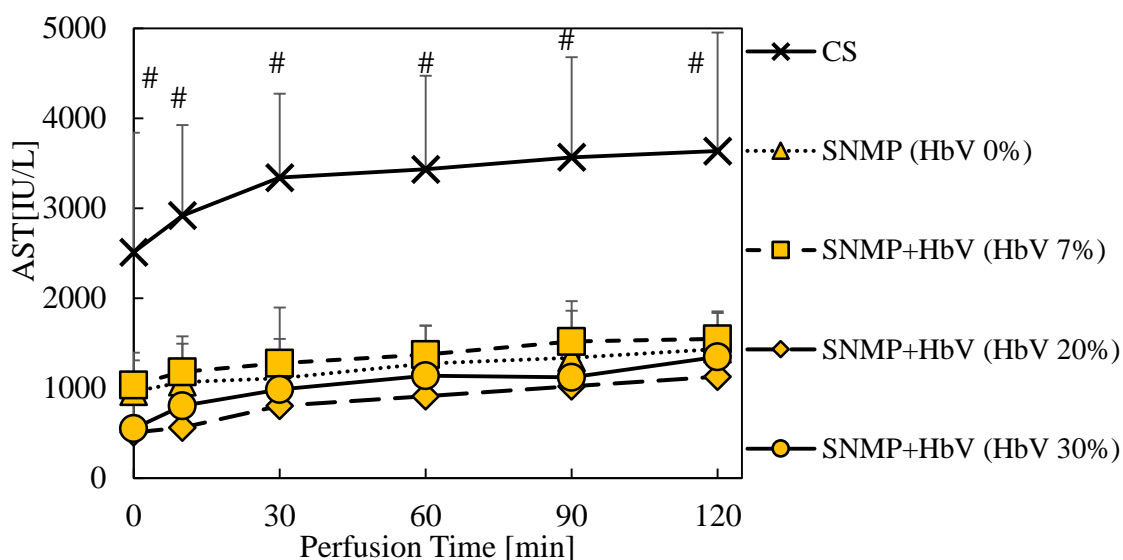


Fig.4.2.29 The amount of AST during IRM after CS or SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

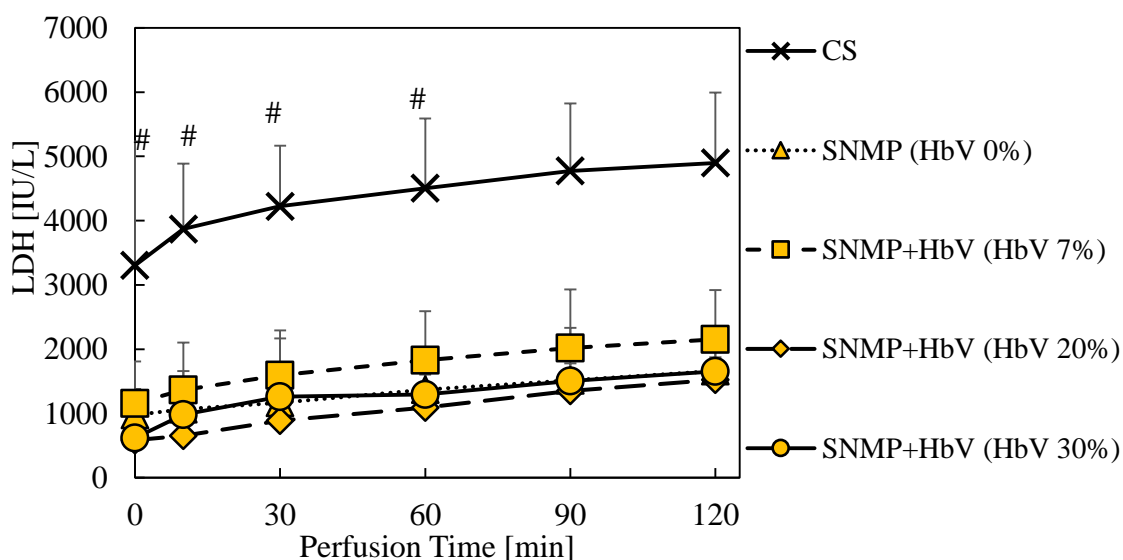


Fig.4.2.30 The amount of LDH during IRM after CS or SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

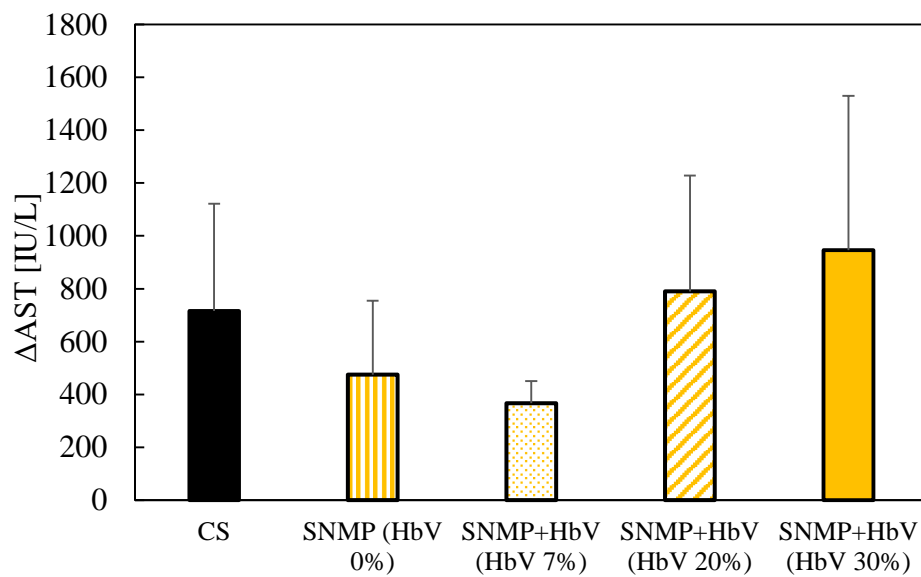


Fig.4.2.31 The release of AST during IRM after CS or SNMP in 120 min

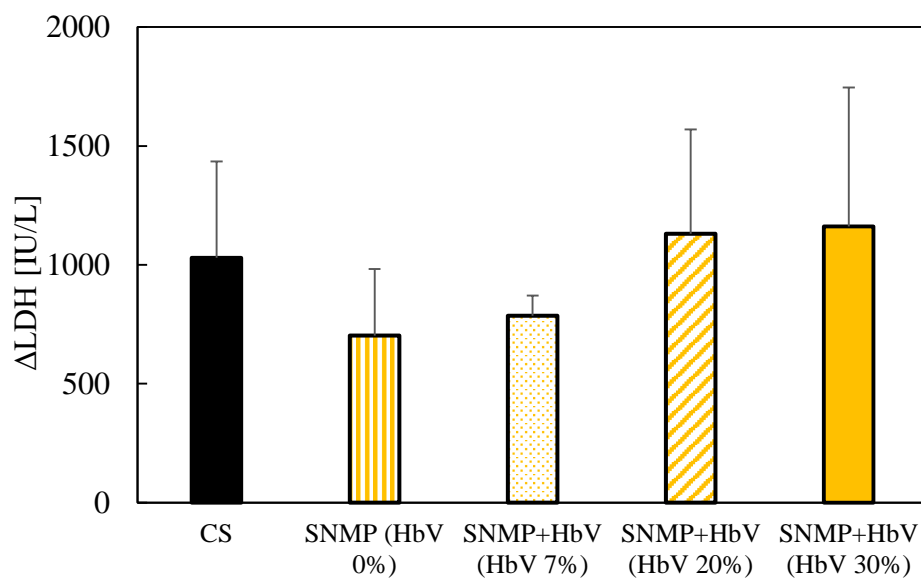


Fig.4.2.32 The release of LDH during IRM after CS or SNMP in 120 min

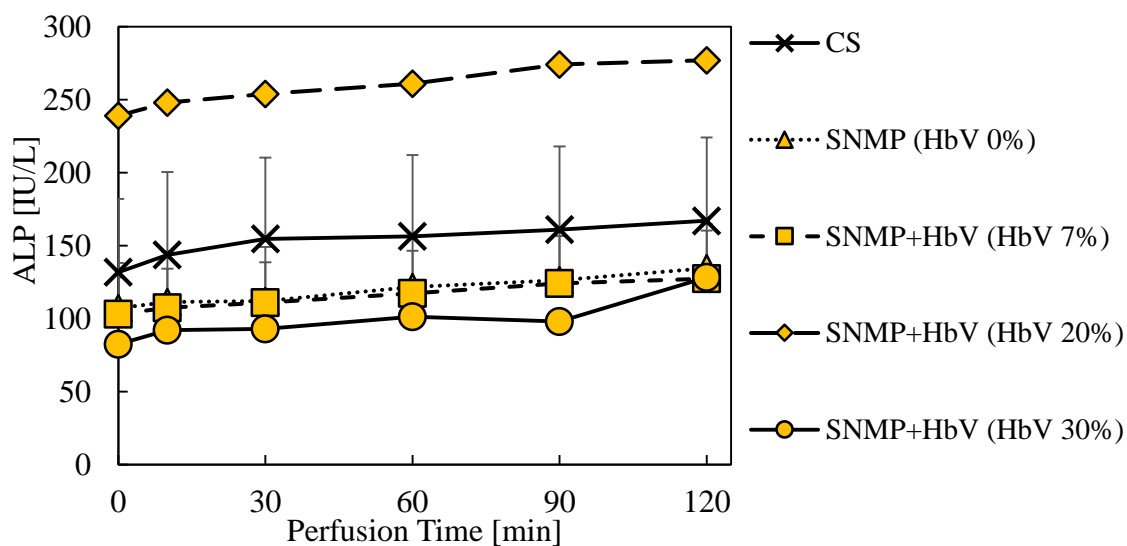


Fig.4.2.33 The amount of ALP during IRM after CS or SNMP

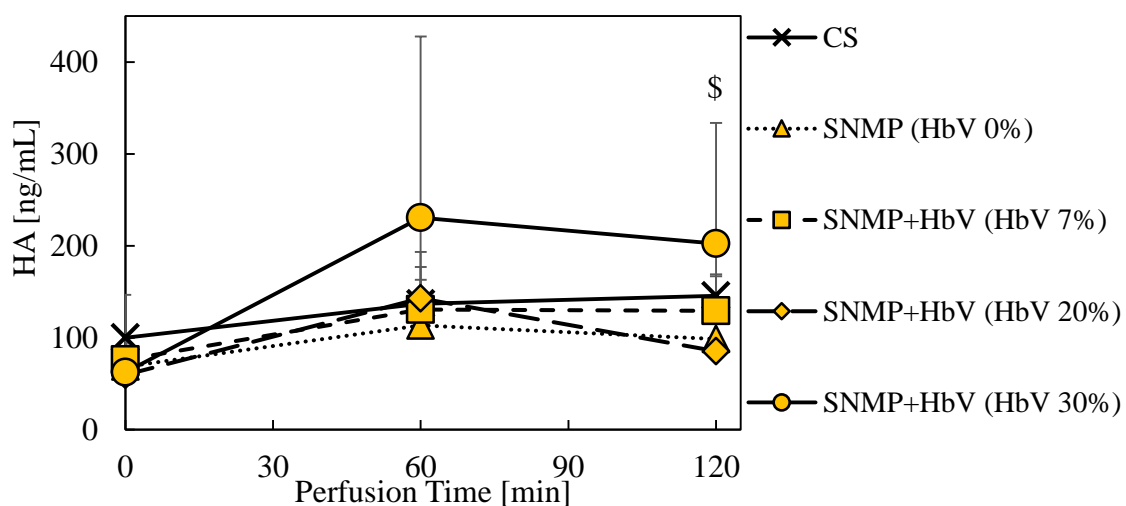


Fig.4.2.34 The amount of HA during IRM after CS or SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

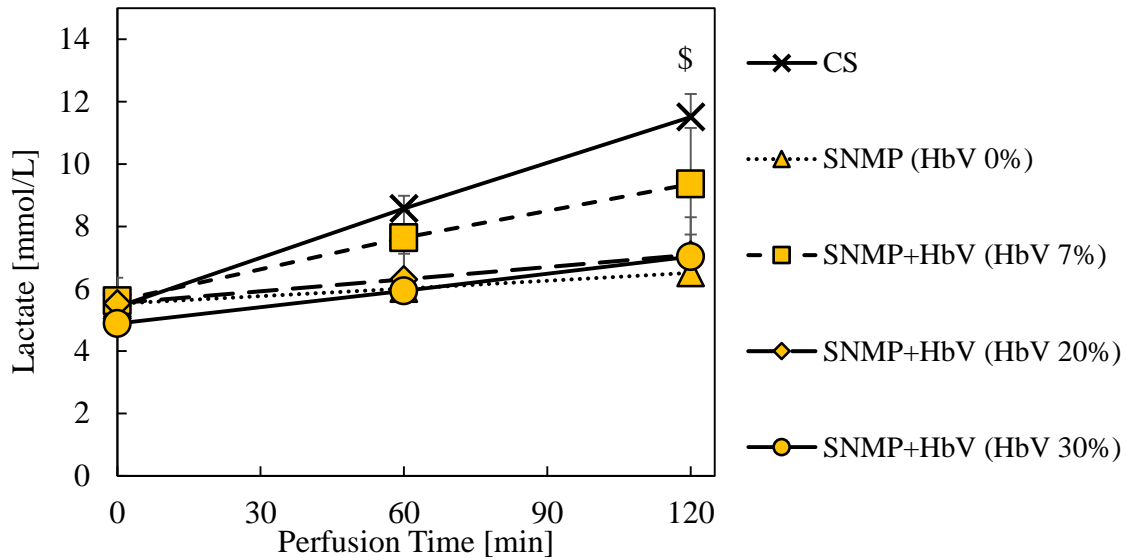


Fig.4.2.35 Lactate level of perfusate during IRM after CS or SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

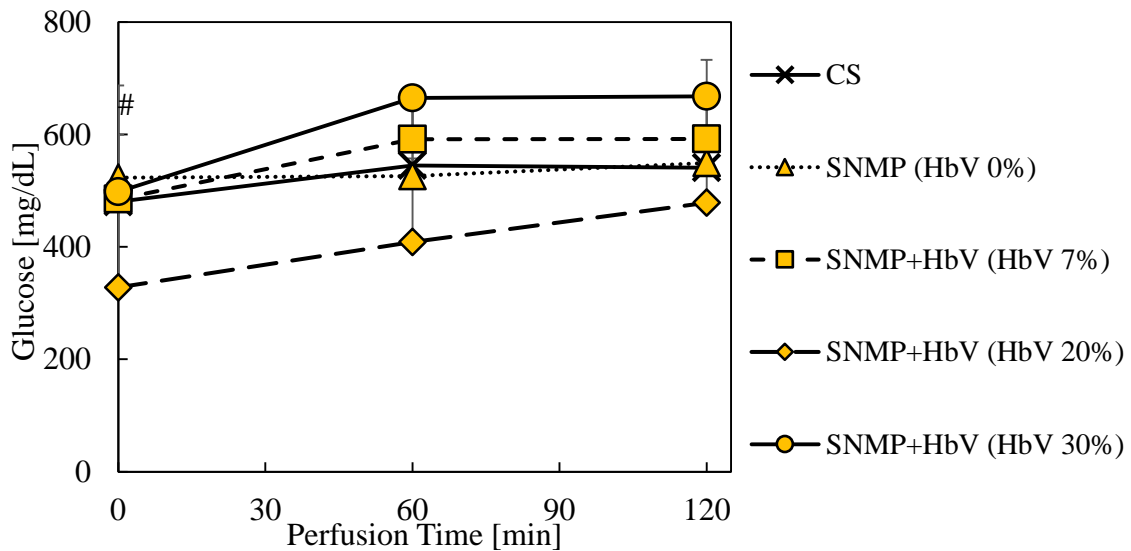


Fig.4.2.36 Glucose level of perfusate during IRM after CS or SNMP

4.2.6 体外血液再灌流モデルによる肝臓代謝因子

体外血液再灌流モデル実験における酸素消費量や灌流液中の pH, またそれに伴う肝臓代謝因子を示す. Fig.4.2.31 には再灌流中の酸素消費量, Fig.4.2.32 には灌流液中 pH を示した. これより, 酸素消費量においては統計学的な差は示されなかったが, SNMP(HbV0%)群において再灌流開始 30 分以降, 最も高値を示した. また灌流液中 pH については, HbV0, 7, 20%の 3 群において pH は 7.4 近くを維持し, 良好な代謝機能を示した. Fig.4.2.33, 34 に示したプロトン指数, および初期値に対するプロトン指数の変化量においても, これも温度一定の条件下であることから灌流液中の pH と同様の傾向を示した.

Fig.4.2.43-46 には臓器の代謝指標となる肝臓代謝指数, およびその初期値に対する変化量を示した. これについても, プロトン指数と同様に HbV0, 7, 20%の三群でやや高値を示したが, 言い換えれば従来の灌流液による保存と差はなかった. 加えて, HbV30%の高濃度群では肝臓代謝指数は低値を示し, 再灌流開始から時間経過とともに低下傾向を示したことから, 重度な代謝機能への障害を有していることが示唆された.

以上のように人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法を検討してきたが, 各種指標において統計学的な差はほとんど示されなかった. 加えて, 肝動脈圧の極端な上昇や, 逸脱酵素流出量が高値を示したことなど, 従来の灌流液による保存と比し劣勢の結果も多く, 室温機械灌流中には若干の代謝機能の改善は示したが, 室温機械灌流法の更なる向上という意味では多数の課題を残した. 考えられる大きな要因として, 4.1 章で示した通り温阻血時間 60 分という実験条件は非常に厳しいものであり, ここからの臓器再生が困難であったことから, たとえ人工酸素運搬体を添加しても差が示されなかったことが考えられる. 加えて, あくまで仮設の域をでないが, 赤血球と比し非常に小さい粒径有する人工

酸素運搬体は、血球が通過できない狭窄血管も通過できるということが一つの利点であったが、本来赤血球が極小な血管内において自身で壁面を押し込みながら物質交換を行うのに対して、その小さな粒径から拡散による物質交換のみとなり、結果として物質交換効率の低下を招いているという可能性も考えられる。本実験では、人工酸素運搬体の有用性を示すことができなかったが、その潜在能力が高いことは明白であるので、濃度や灌流液の総流量の検討、あるいはモデル実験による原理の解明など、今後も課題克服のための議論が必要である。

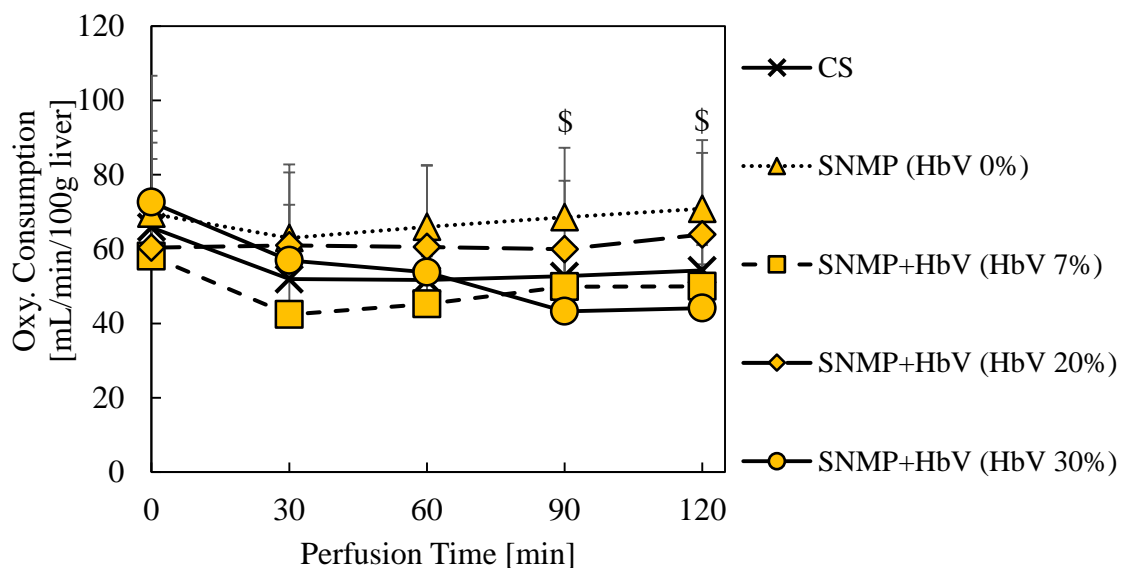


Fig.4.2.37 Oxy. Consumption during IRM after CS or SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%), \$SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

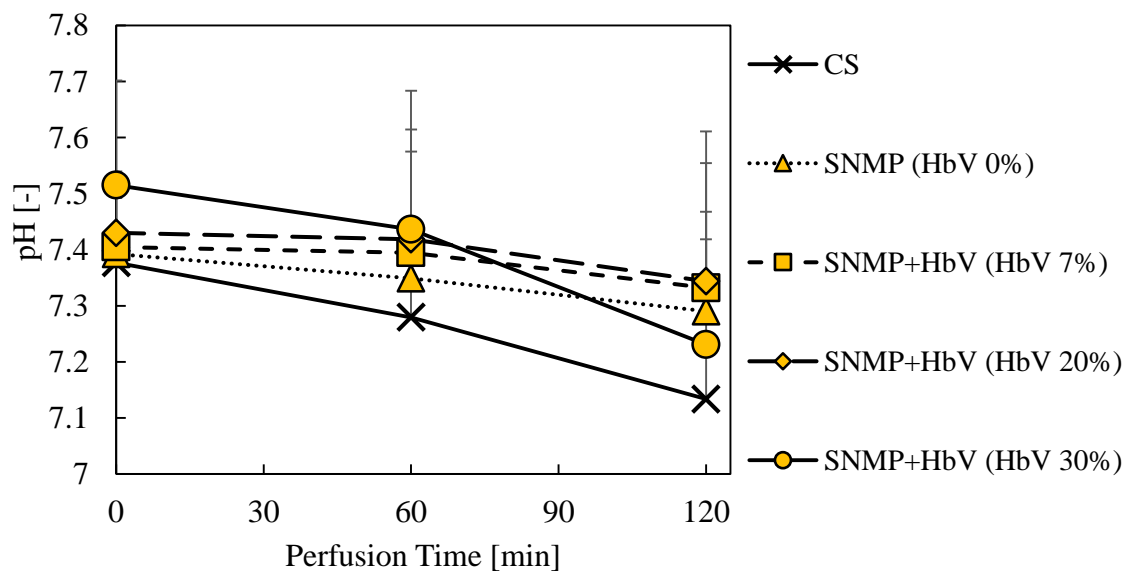


Fig.4.2.38 pH of perfusate during IRM after CS or SNMP

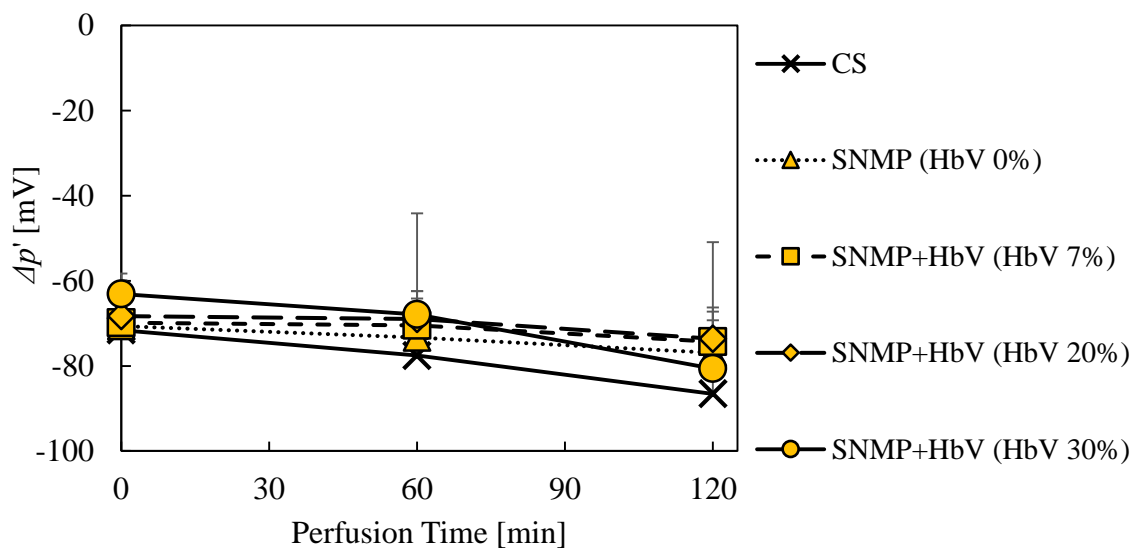


Fig.4.2.39 Proton index during SNMP

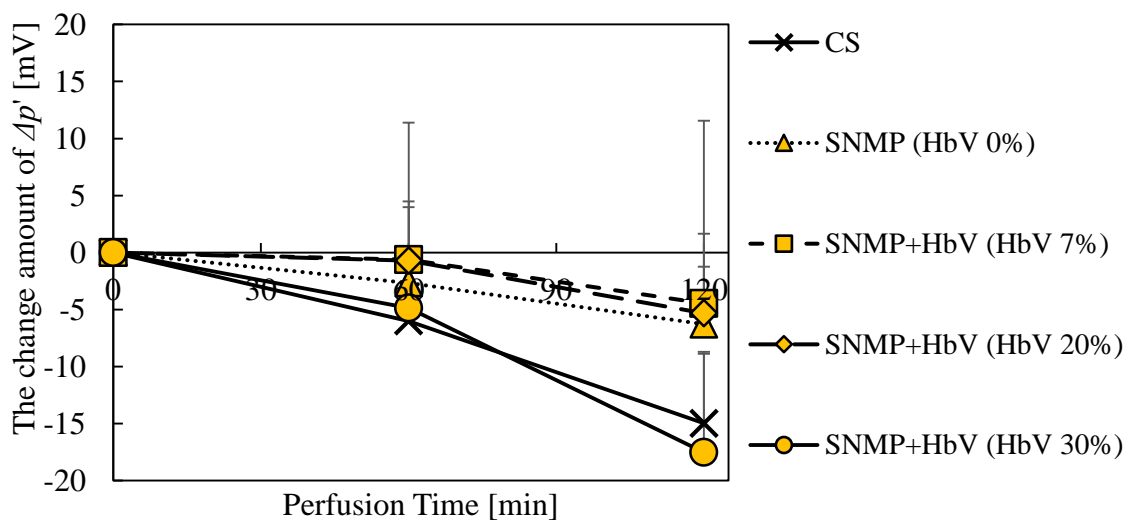


Fig.4.2.40 The change amount of proton index during IRM after CS or SNMP

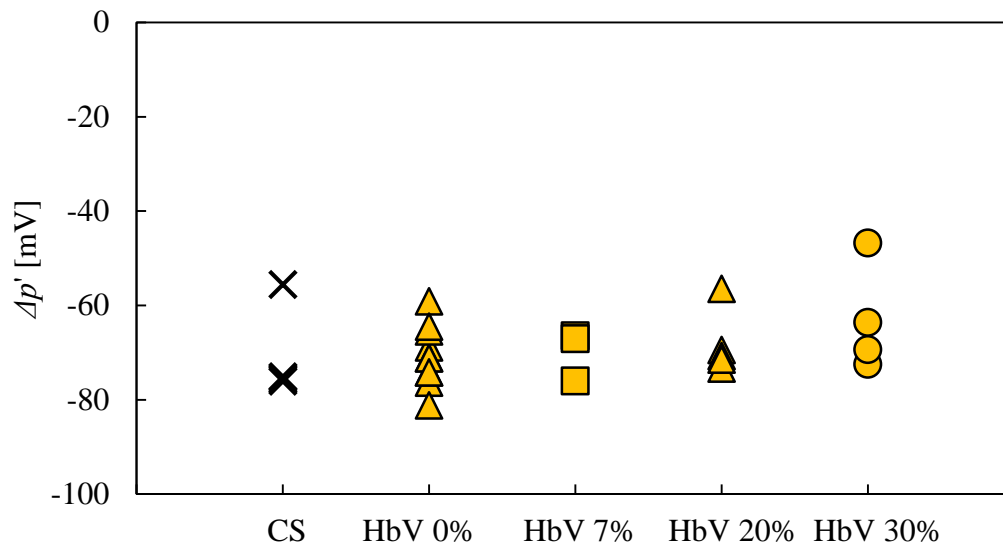


Fig.4.2.41 Proton index during IRM after CS or SNMP at 0min

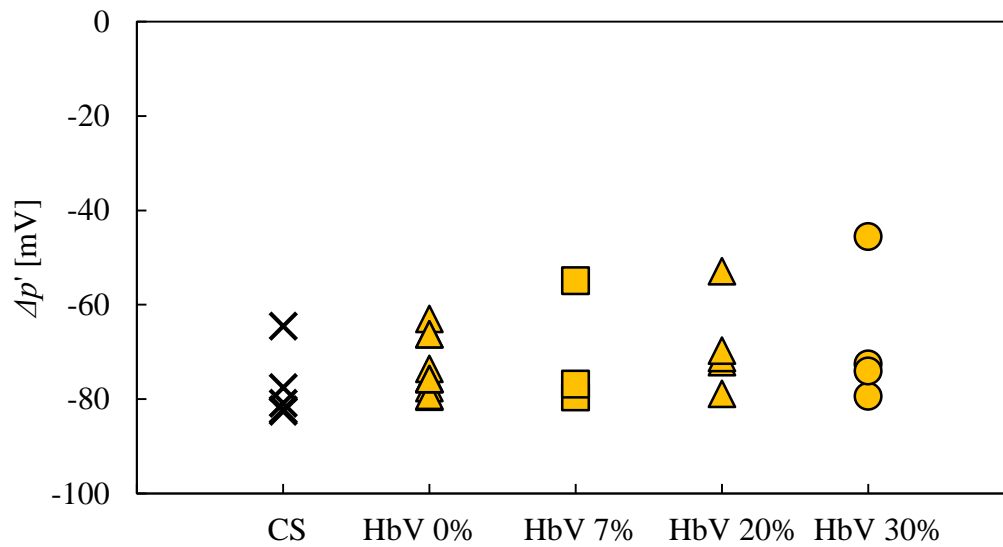


Fig.4.2.42 Proton index during IRM after CS or SNMP at 60min

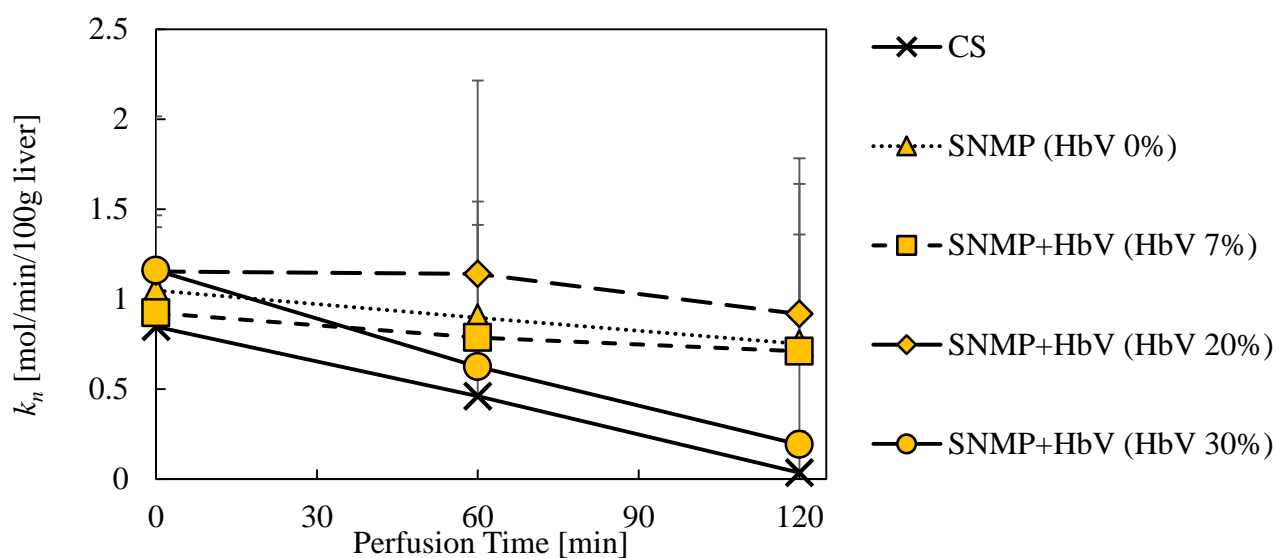


Fig.4.2.43 Metabolic index during IRM after CS or SNMP

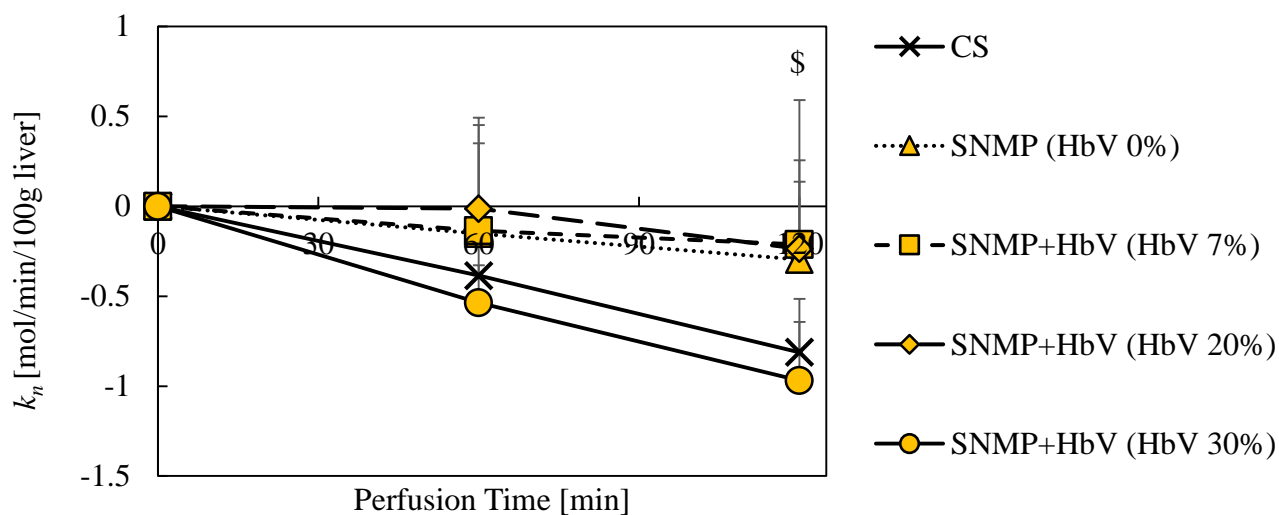


Fig.4.2.44 The change amount of Metabolic index during IRM after CS or SNMP

*SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV7%), #SNMP(HbV0%) vs SNMP(HbV20%),
\$SNMP(HbV0) vs SNMP(HbV30%); $p < 0.05$

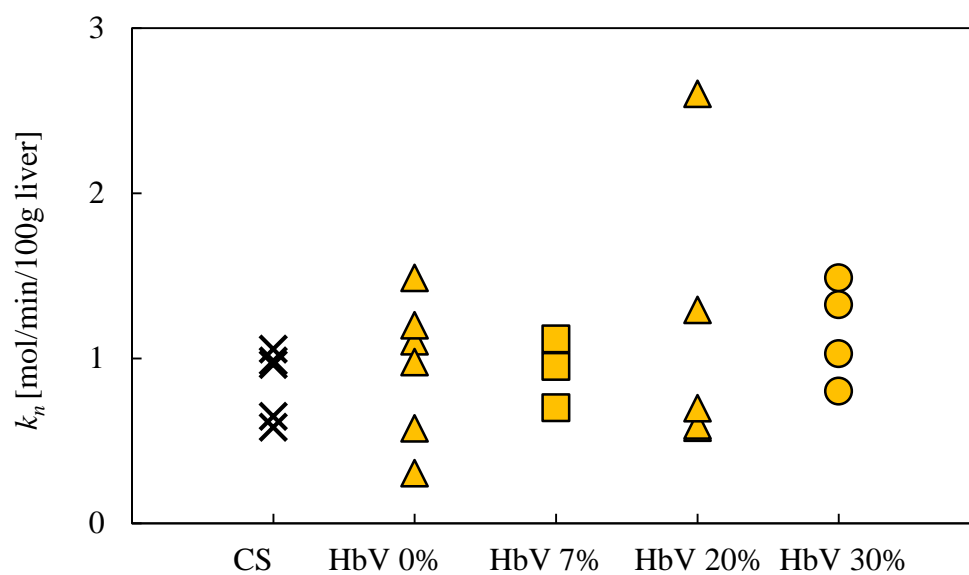


Fig.4.2.45 Metabolism index during IRM after CS or SNMP at 0min

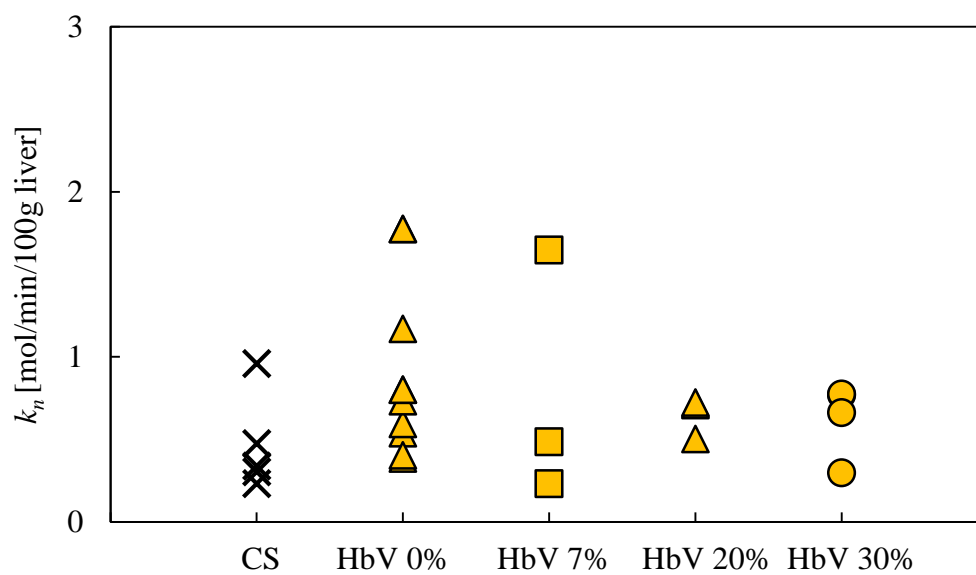


Fig.4.2.46 Metabolism index during IRM after CS or SNMP at 60min

4.3 分割肝移植への低温機械灌流法の適用

4.3.1 低温灌流中の流動指標

4時間の低温機械灌流中に得られた灌流量，血管圧力，血管抵抗の流動指標を示す．Fig.4.3.1,2には，門脈，肝動脈における灌流流量を示した．実験条件に示した通り，灌流は一定流量の条件下で行った．

Fig.4.3.3, 4には門脈，肝動脈における血管圧力，Fig.4.3.5, 6には血管抵抗を示した．本実験では，全て脳死後摘出臓器を想定して温阻血時間なしで摘出しているため，全肝であればその機能は健全性が維持されていることから，血管圧力も常に低値を維持した．一方，分割肝では単純な肝切除による障害はもちろん，バックテーブルで分割をおこなった SBP(Split before perfusion)群では冷阻血時間や術中の温度上昇による障害を受けていることが予想される．実際に肝動脈圧では，分割肝二群でやや高値を示した．一方で血管抵抗については，分割肝はグラフト重量が三分の一程度で，灌流量は全肝と同条件で行ったことにより，全肝と比し良好な結果を示し，流量応答性が十分に機能していることを示した．

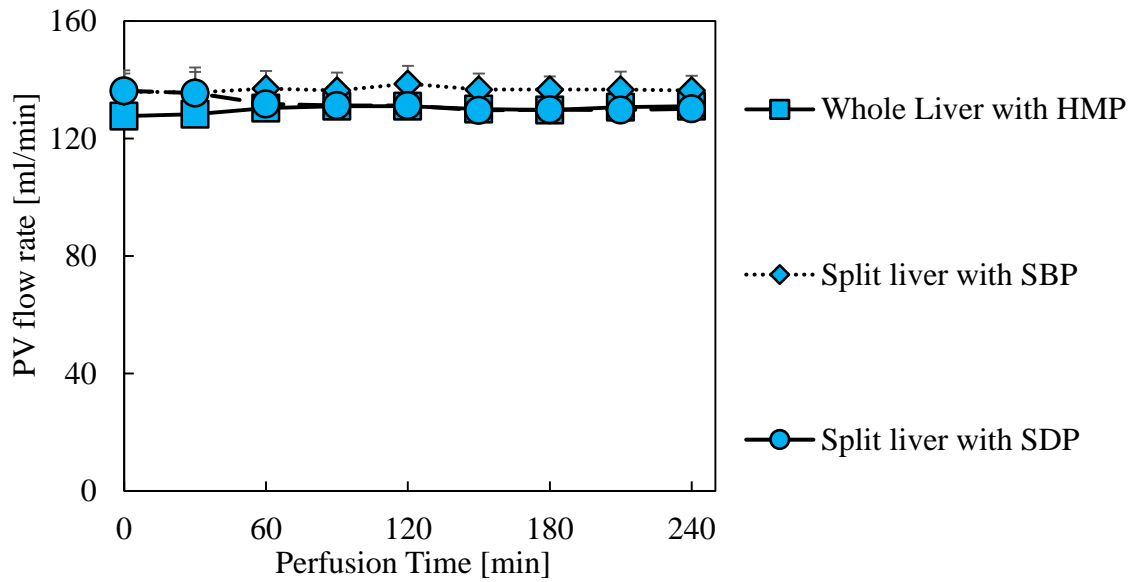


Fig.4.3.1 Flow rate of PV during HMP

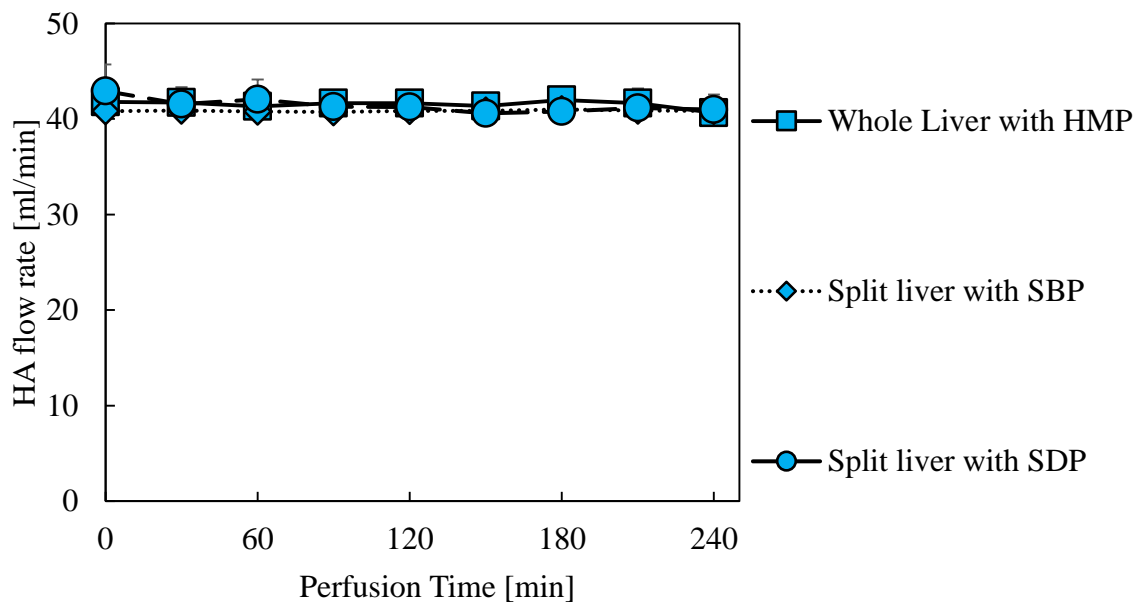


Fig.4.3.2 Flow rate of HA during HMP

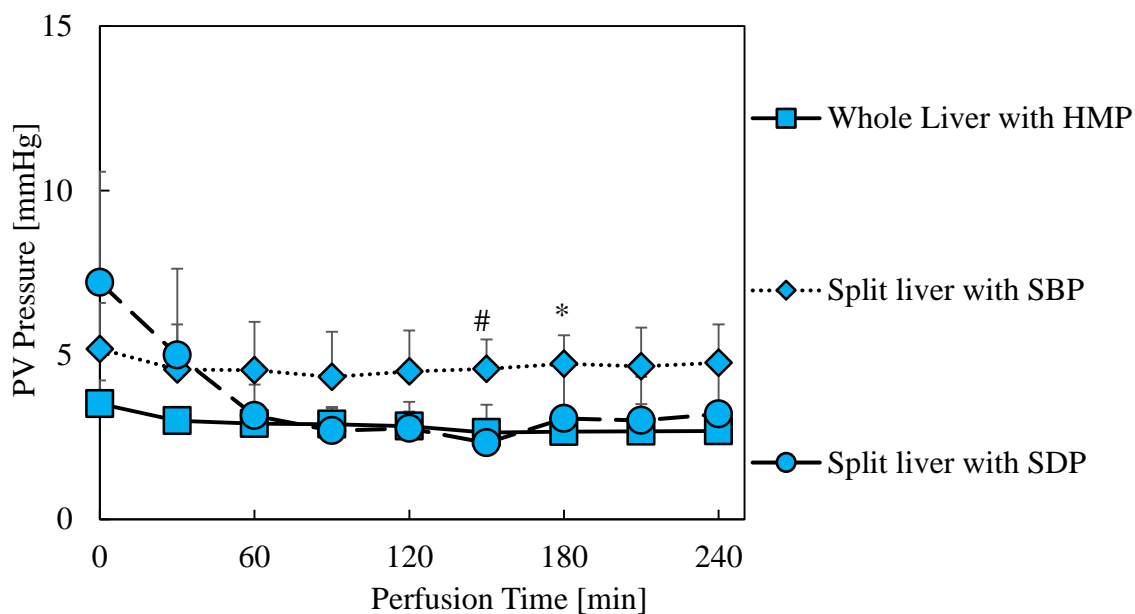


Fig.4.3.3 PV Pressure during HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP; $p < 0.05$

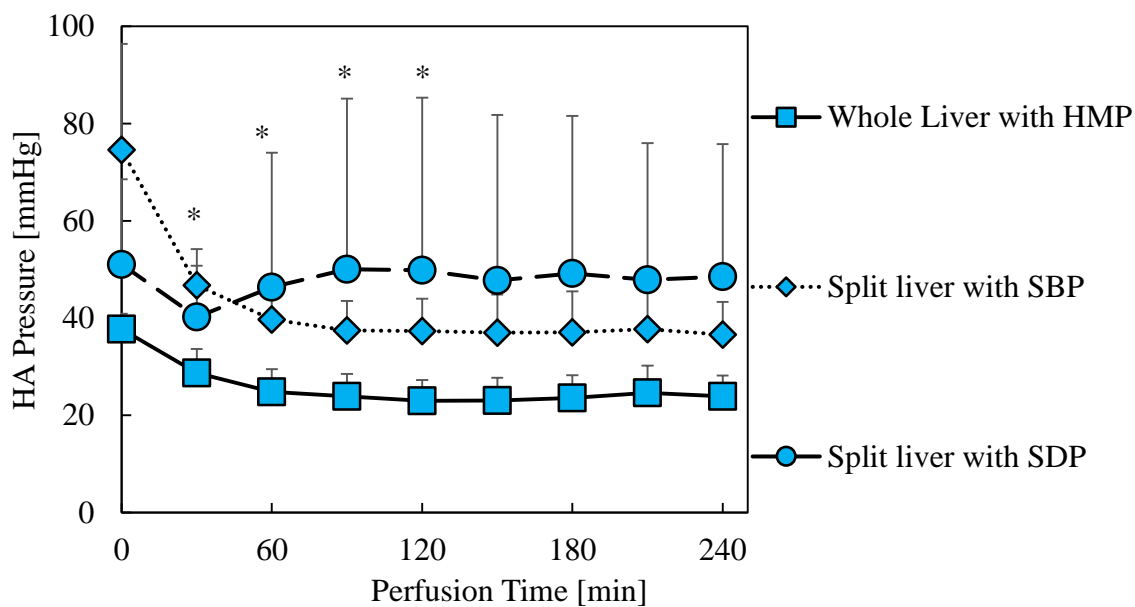


Fig.4.3.4 HA Pressure during HMP

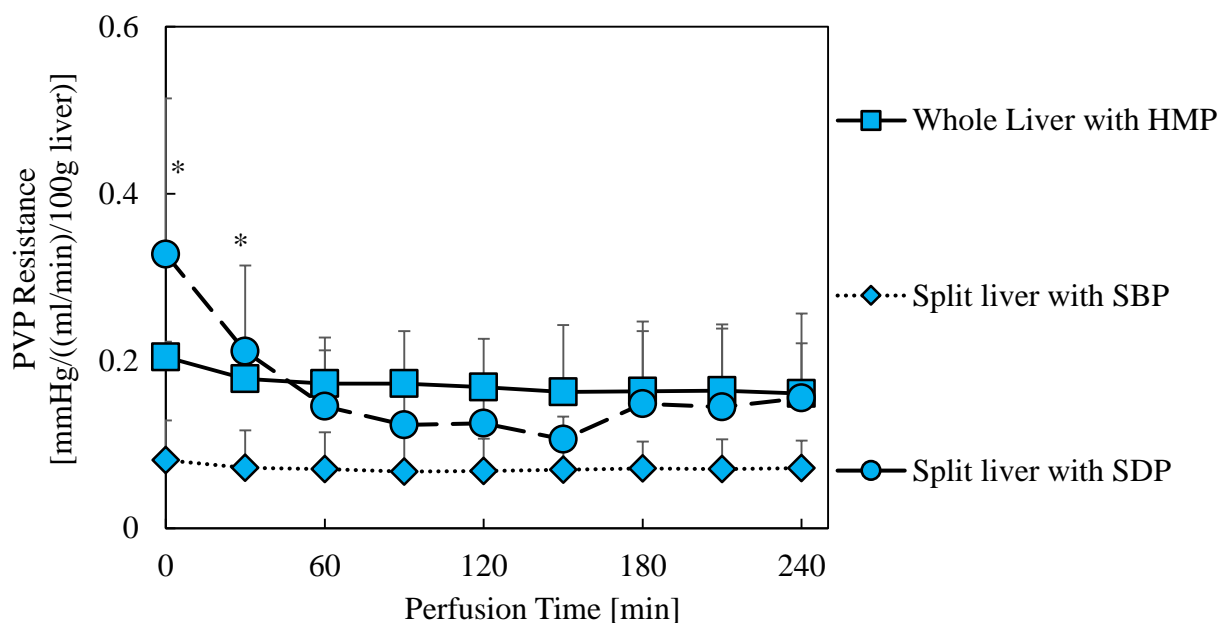


Fig.4.3.5 PVP Resistance during HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
#Split liver with SBP vs Split liver with SDP; $p < 0.05$

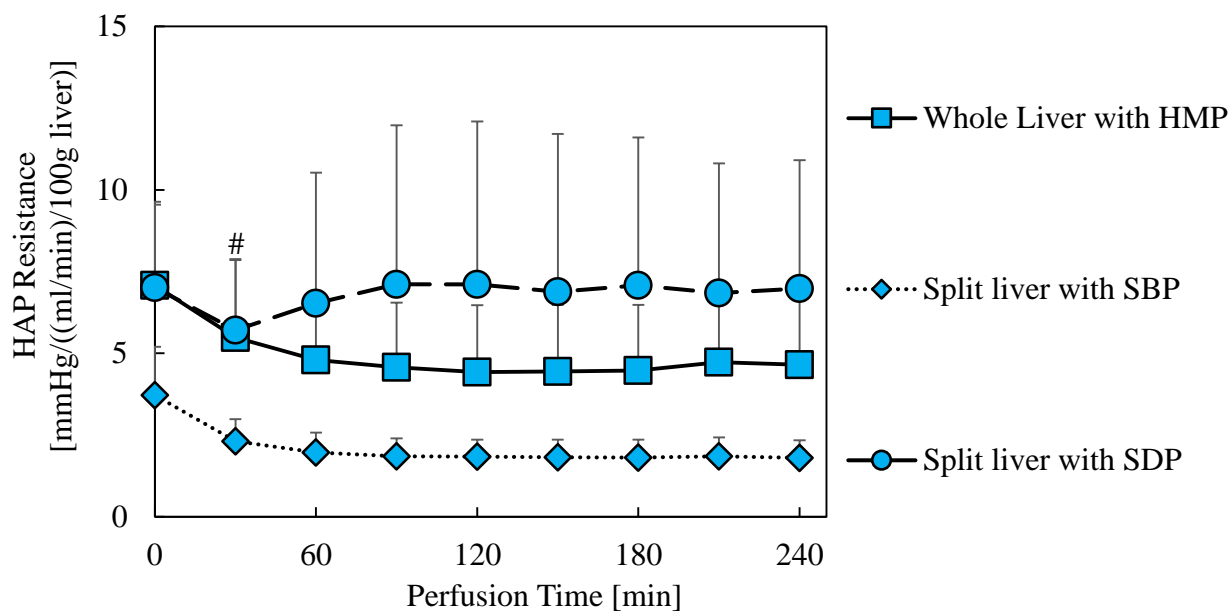


Fig.4.3.6 HAP Resistance during HMP

4.3.2 低温灌流中の肝機能指標

4 時間の低温機械灌流中に得られた肝機能指標である逸脱酵素 AST, LDH の結果を示す. Fig4.3.7-12 には逸脱酵素 AST, LDH の時間ごとの蓄積量, および SDP(Split during perfusion)の分割処理のおおよその時間までとなる, 灌流 1 時間までの逸脱酵素流出量, 灌流 4 時間の逸脱酵素流出量を示した. これより, 逸脱酵素蓄積量には, 統計学的な差は示されなかったが, 分割処理にかかった 1 時間の逸脱酵素流出量は SDP 群においてやや高値を示し, 分割処理による肝機能への障害を有していることが示唆された. しかしながら, これも統計学的な差はなく, 加えてその後の逸脱酵素流出量は全肝と同程度で安定していたことから, 分割肝グラフトであっても低温機械灌流法により十分な機能温存が行えていたことが示唆された.

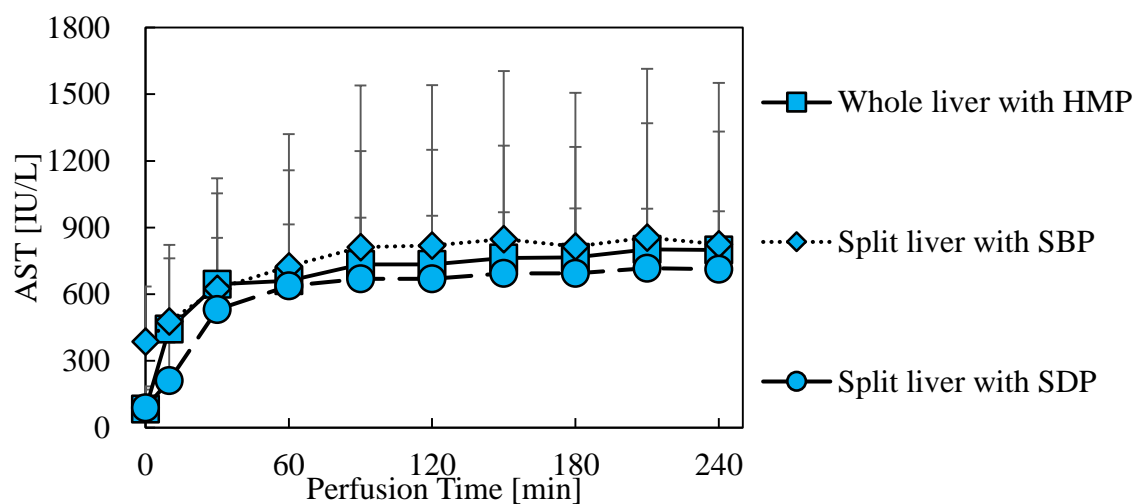


Fig.4.3.7 The amount of AST during HMP

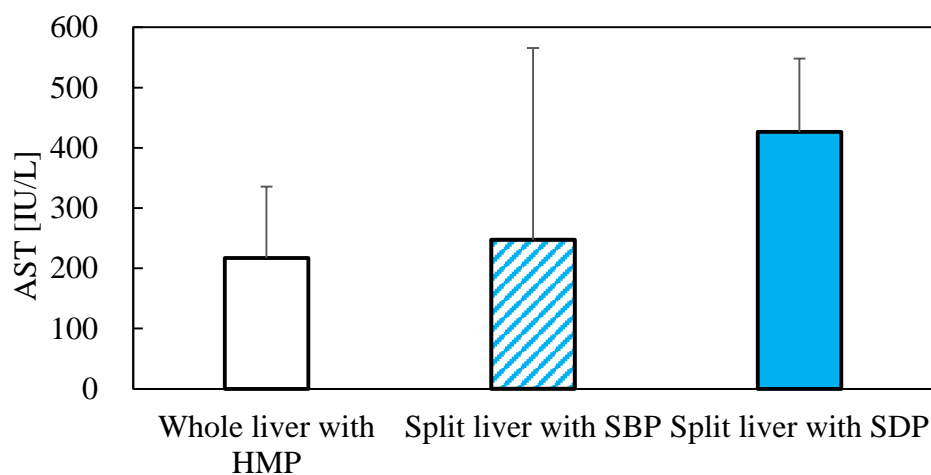


Fig.4.3.8 The release of AST during HMP in 60 min

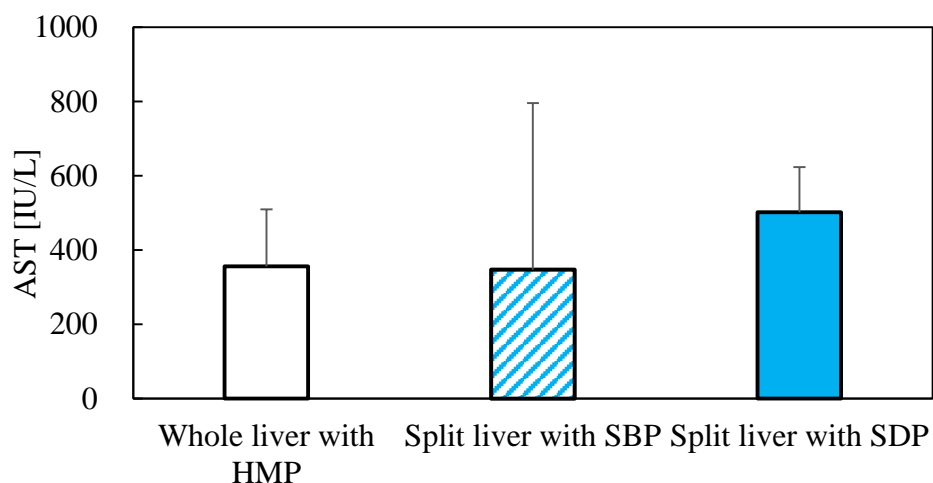


Fig.4.3.9 The release of AST during HMP in 240 min

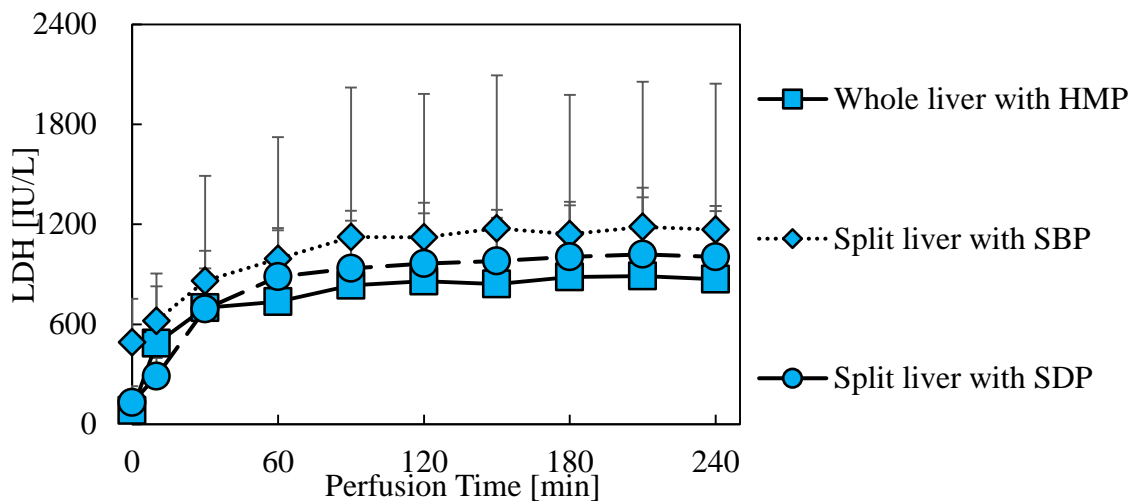


Fig.4.3.10 The amount of LDH during HMP

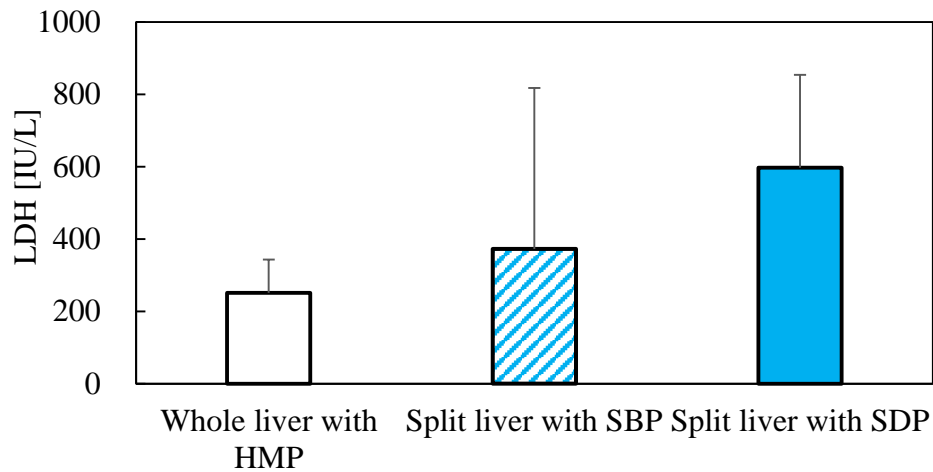


Fig.4.3.11 The release of LDH during HMP in 60 min

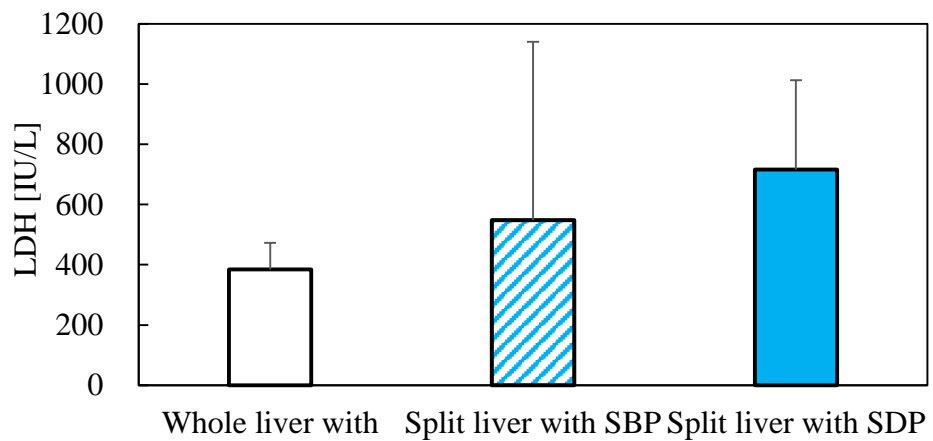


Fig.4.3.12 The release of LDH during HMP in 240 min

4.3.3 低温灌流中の肝臓代謝因子

4時間の低温機械灌流中に得られた各種代謝指標の結果を示す。ただし酸素消費量については、分割肝グラフトの肝重量が小さいこと、低温での灌流によって代謝が抑制されていたことで十分な測定精度で計測を行えなかったため、今回は除外した。Fig.4.3.13には、灌流液中 pH, Fig.4.3.14, 15にはそれに対応したプロトン指数と初期値に対するその変化量を示した。これより、分割肝は灌流初期においてプロトン指数はやや低値を示し、若干の代謝機能への障害が示されたが、最終的には全肝と同様の水準までの機能回復が示された。特に SDP 群においては、逸脱酵素同様に灌流しながらの処理による障害性の液性因子の流出による代謝機能の低下が示唆されたが、時間とともにその代謝機能が改善されたことは明らかであるといえる。

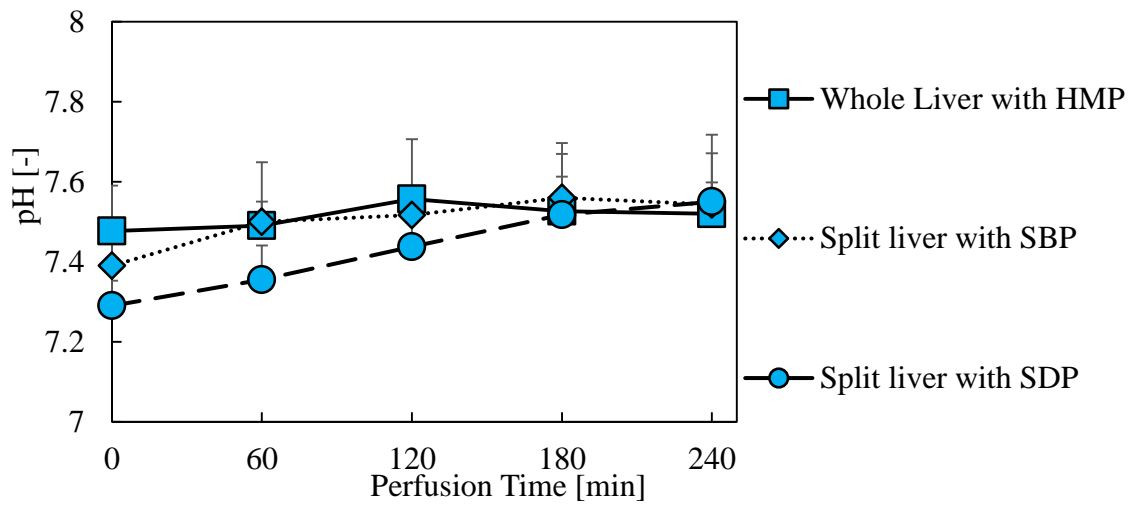


Fig.4.3.13 pH of perfusate during HMP

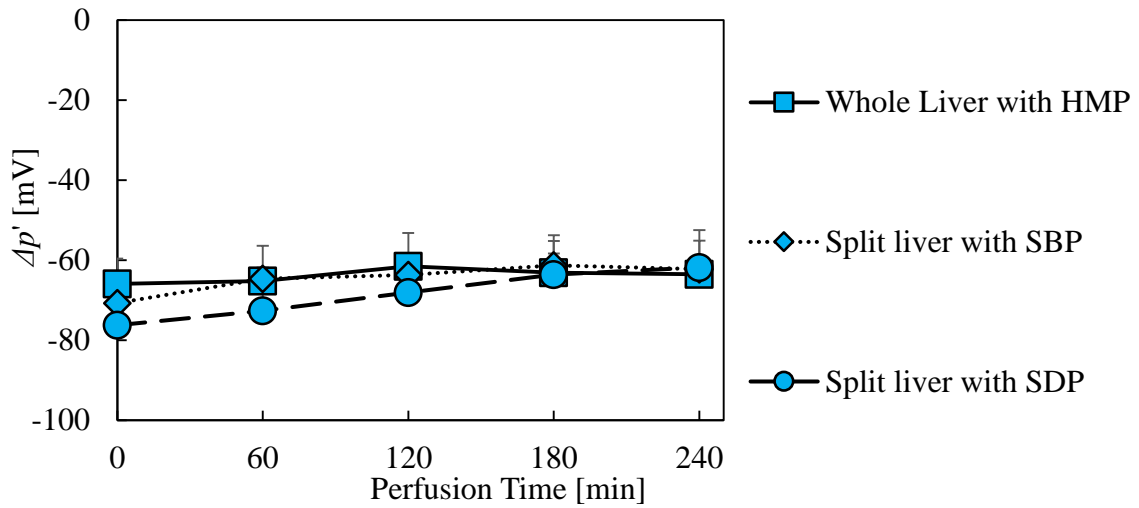


Fig.4.3.14 Proton index during HMP

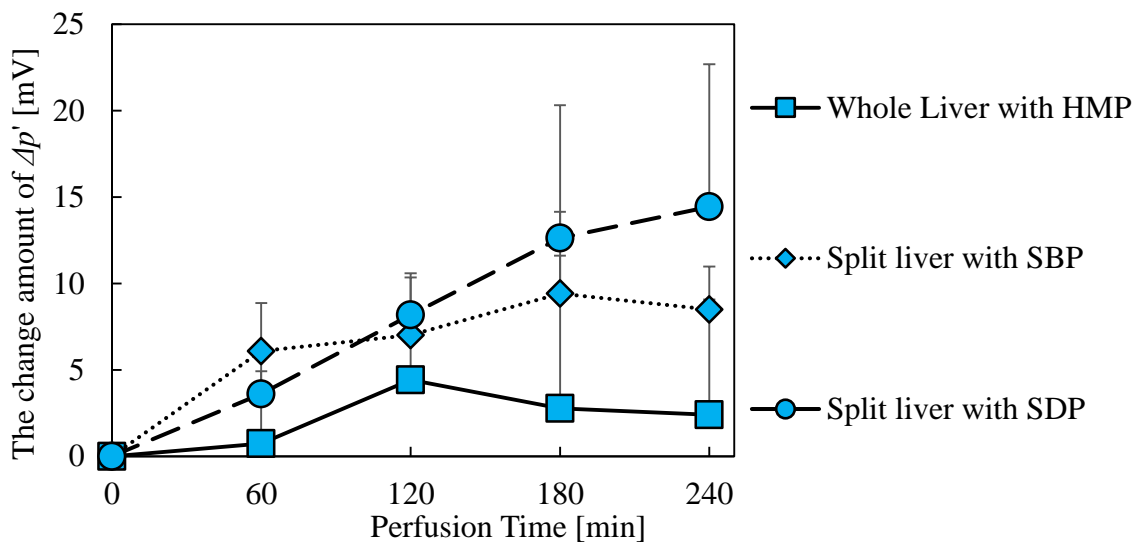


Fig.4.3.15 The change amount of proton index during HMP

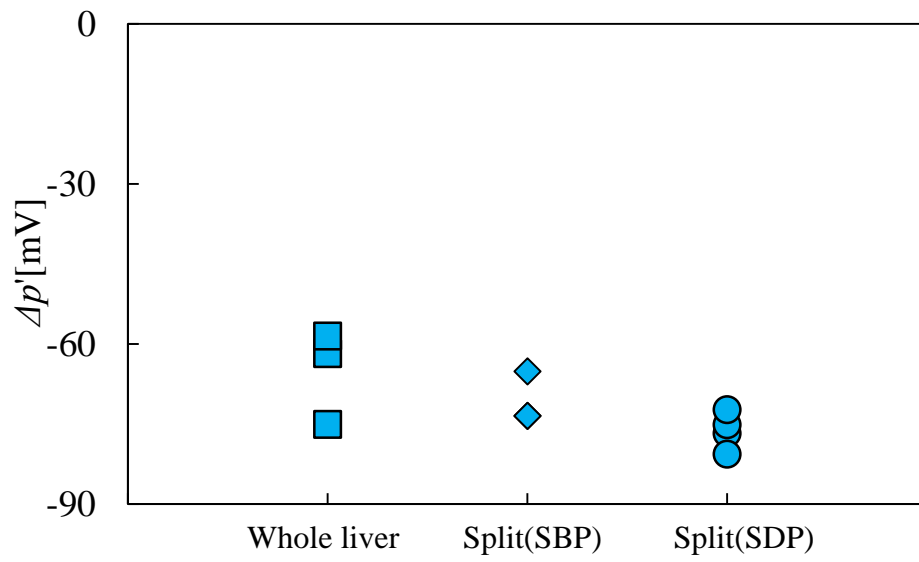


Fig.4.3.16 Proton index during HMP at 0min

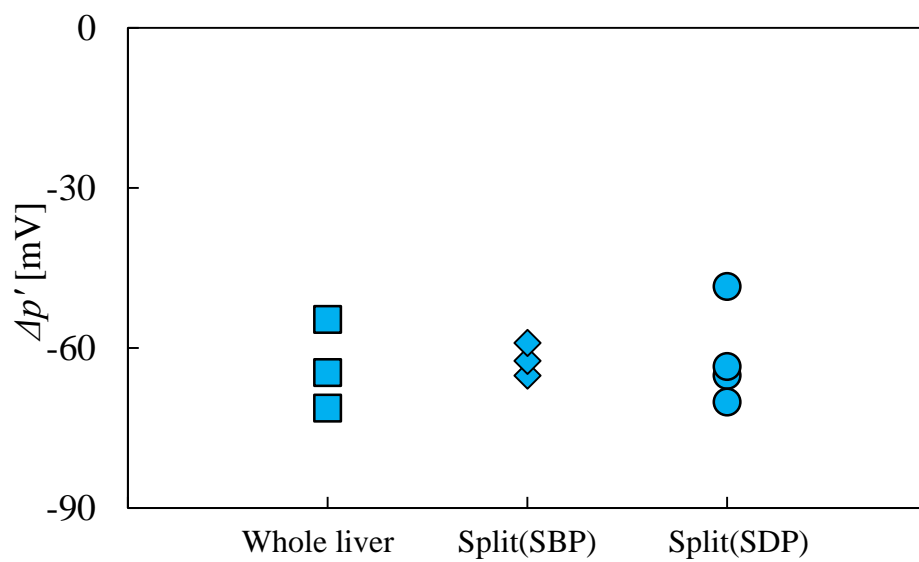


Fig.4.3.17 Proton index during HMP at 240min

4.3.4 体外血液再灌流モデルによる流動指標

4 時間の単純冷却保存，あるいは低温機械灌流を行った後に，その臓器機能と保存技術の検証に行った体外血液再灌流モデル実験について，その流動指標を示す．Fig.4.3.18, 19 には門脈，肝動脈における灌流量を示した．実験条件で示した通り，基本的には灌流量は一定としたが，一部肝動脈において圧量が極端に上昇した場合にのみ限り，若干の調整を行った．

Fig.4.3.20-23 には門脈，肝動脈それぞれの血管圧力，血管抵抗を示した．単純冷却保存群においては，門脈，肝動脈ともに統計学的に有意に高値を示し，再灌流開始直後には急激な血管圧上昇による虚血再灌流障害の傾向もしめしたことから，分割処理による重度の流動障害が示された．また全肝と比し，SBP 群でも有意に高値を示したが，SDP 群においては統計学的な差は示されずに，良好な流動機能が示唆された．

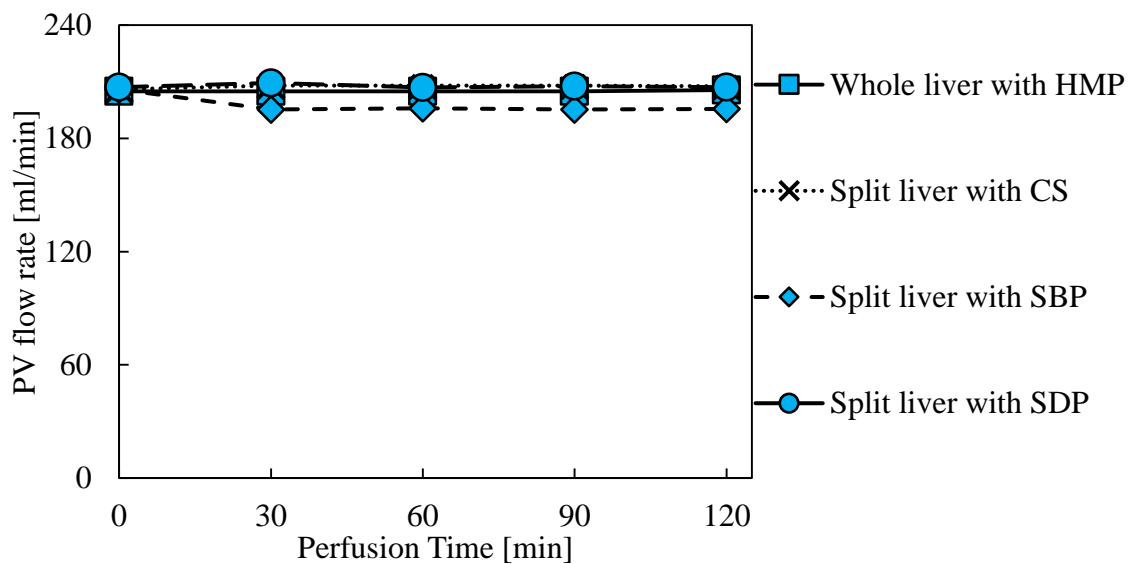


Fig.4.3.18 Flow rate of PV during IRM after CS or HMP

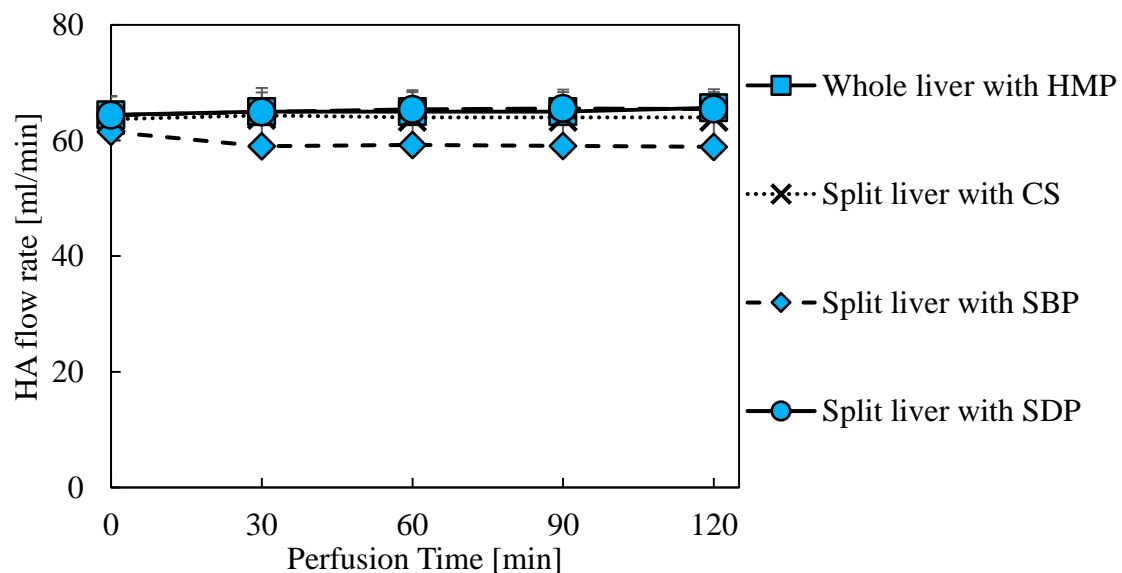


Fig.4.3.19 Flow rate of HA during IRM after CS or HMP

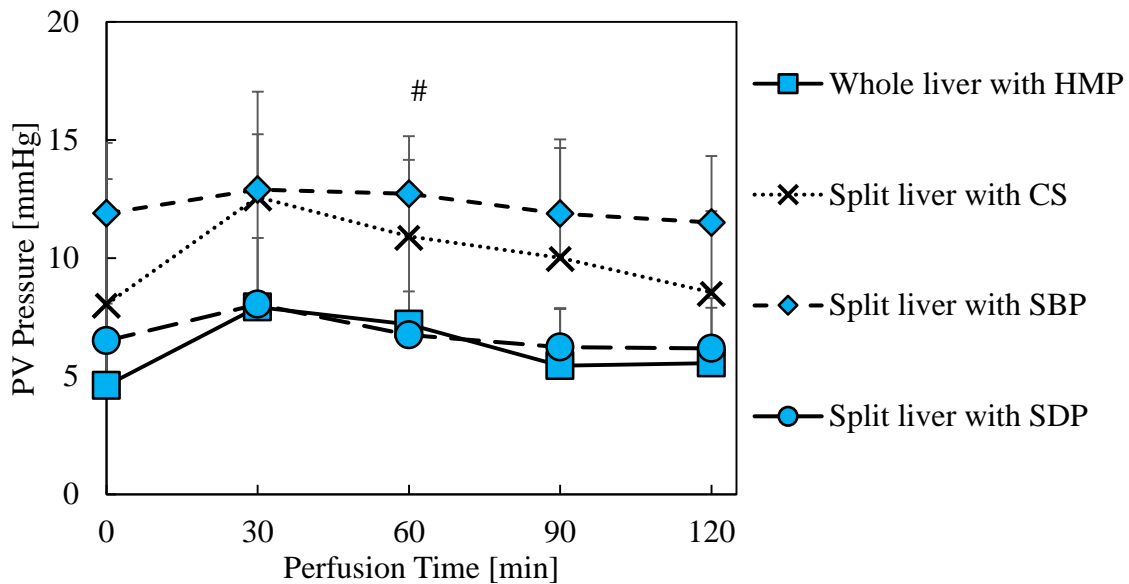


Fig.4.3.20 PV Pressure during IRM after CS or HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,

#Split liver with SBP vs Split liver with SDP,

\$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

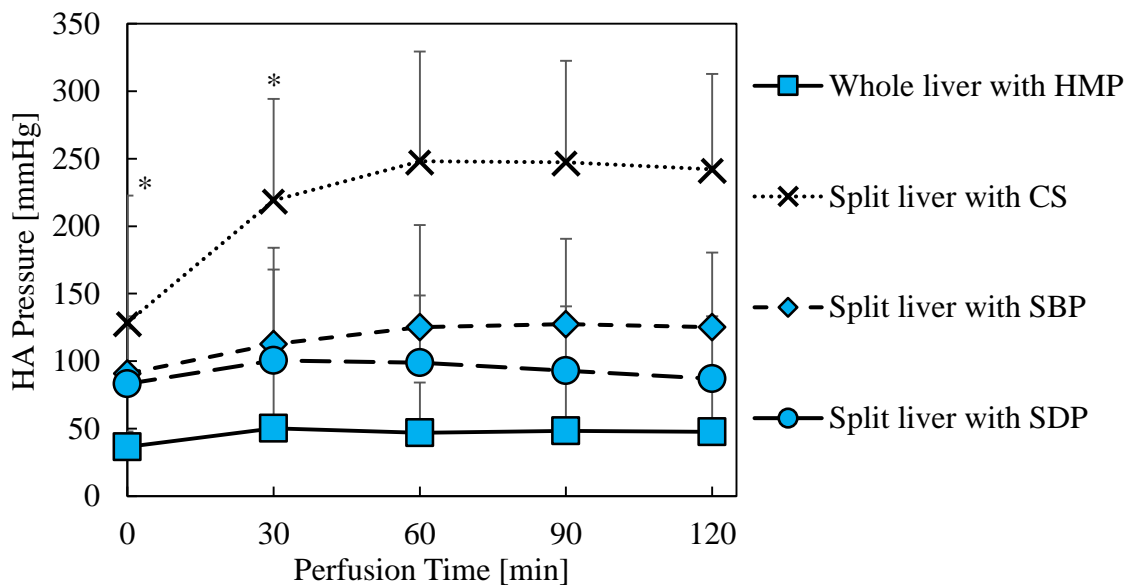


Fig.4.3.21 HA Pressure during IRM after CS or HMP

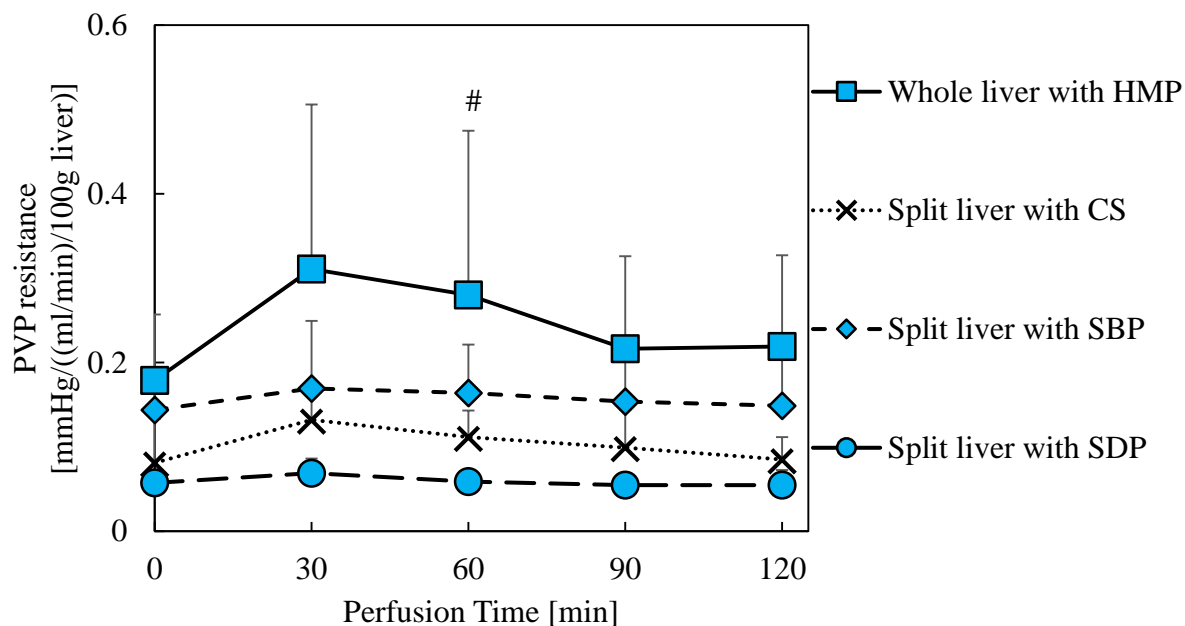


Fig.4.3.22 PVP Resistance during IRM after CS or HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP,
 \$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

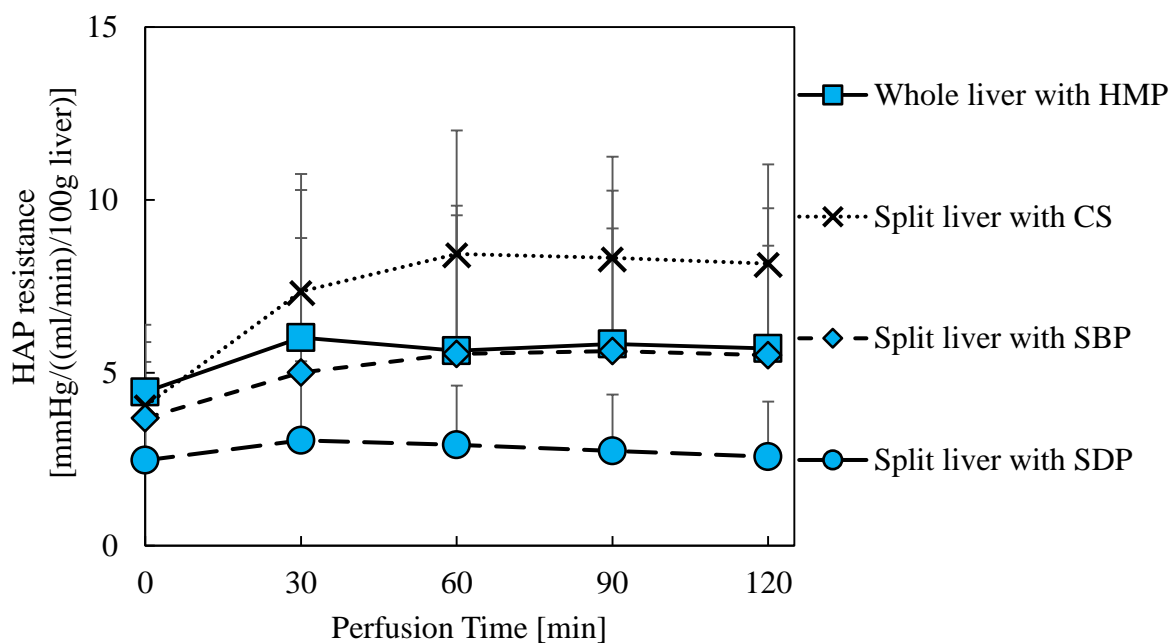


Fig.4.3.23 HAP Resistance during IRM after CS or HMP

4.3.5 体外血液再灌流モデルによる肝機能指標

体外血液再灌流モデル実験による肝機能指標である各種逸脱酵素，および血液ガス分析によるバイオマーカーの測定結果を示す．Fig.4.3.24-27 には肝機能指標である逸脱酵素 AST, LDH の蓄積量，および再灌流 2 時間での総流出量を示した．これより，SBP 群，および SDP 群の分割肝，低温機械灌流群において逸脱酵素蓄積量，総流出量は統計学的に有意に良好な結果を示し，良好な肝機能が明らかとなった．これは分割グラフトが，全肝と比し三分の一程度の重量であることも影響していると考えられるが，重量比を考慮しても全肝と同程度の肝機能であり，分割処理によって生じた障害の回復が示された(Fig.4.3.28, 29)．一方で，Fig.4.3.30 に示したヒアルロン酸流出量では，SBP 群において高値を示し，血管内皮への障害を有していることが示唆された．

Fig.4.3.31 に示した再灌流液中の乳酸では，全肝と同程度の低値を示したことから，酸塩基平衡の健全性が示された．Fig.4.3.32 に示したグルコースでは，全肝と比し分割肝群ではやや低値を示した．しかしながら再灌流の時間とともに上昇傾向にあること，そして逸脱酵素と同様に肝重量比を考慮すると，十分に健全な糖代謝の機能が維持されていることが予想される．

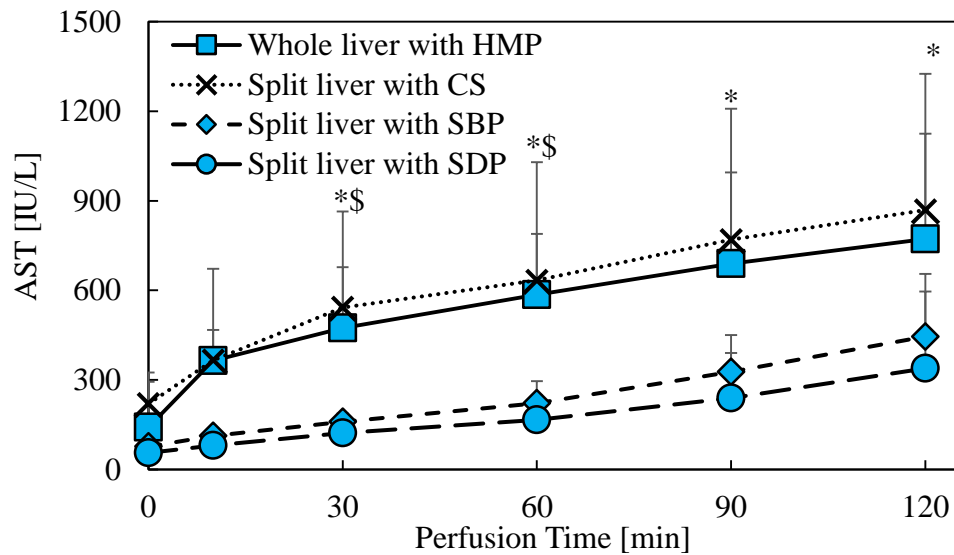


Fig.4.3.24 The amount of AST during IRM after CS or HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP,
 \$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

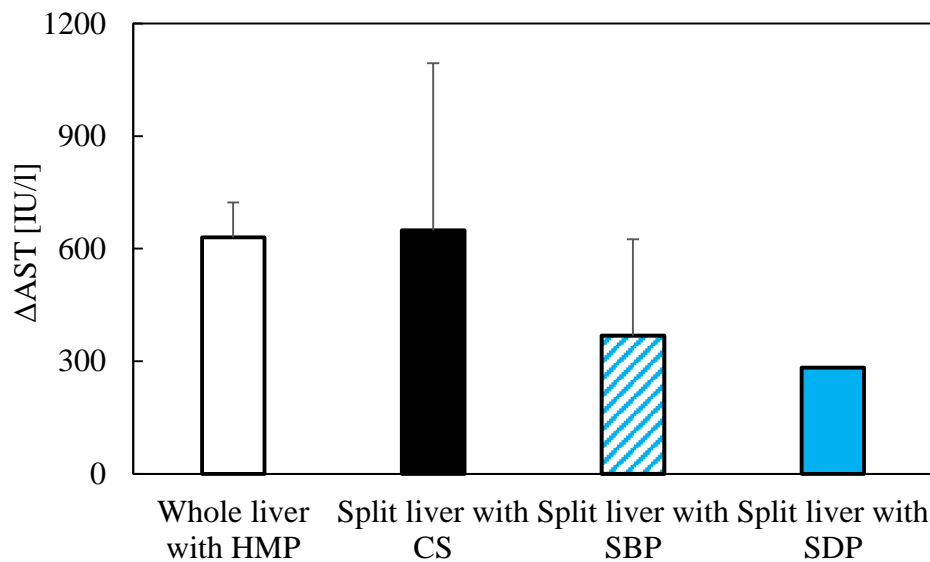


Fig.4.3.25 The release of AST during IRM after CS or HMP in 120 min

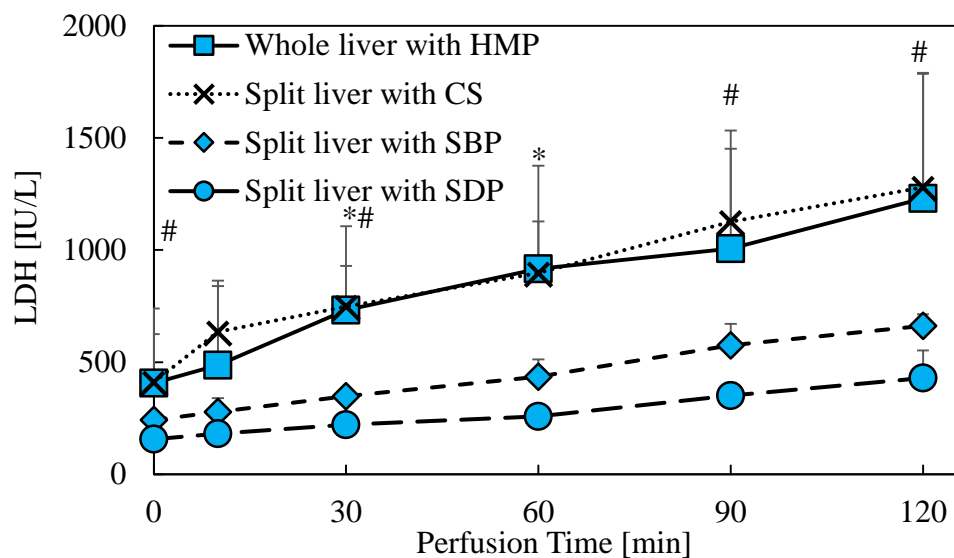


Fig.4.3.26 The amount of LDH during IRM after CS or HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP,
 \$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

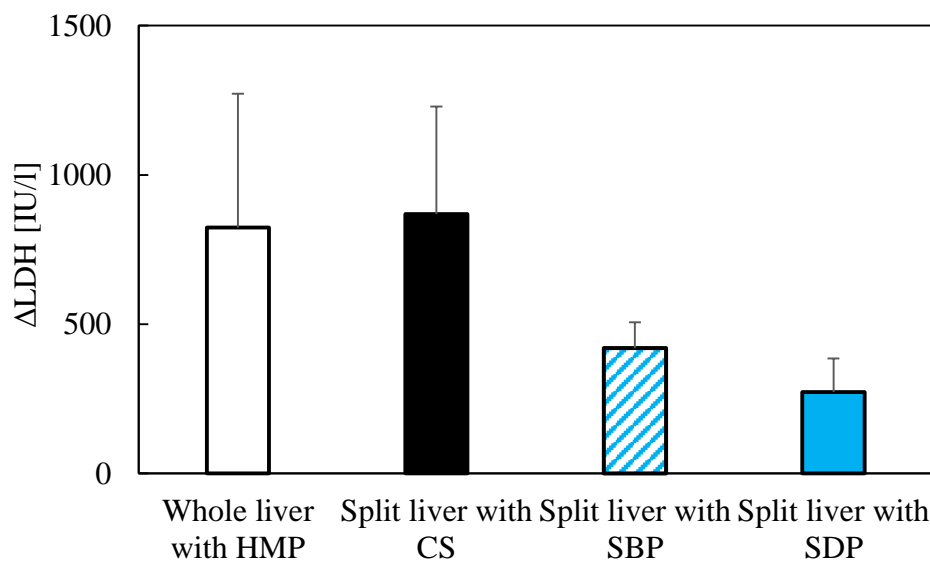


Fig.4.3.27 The release of LDH during IRM after CS or HMP in 120 min

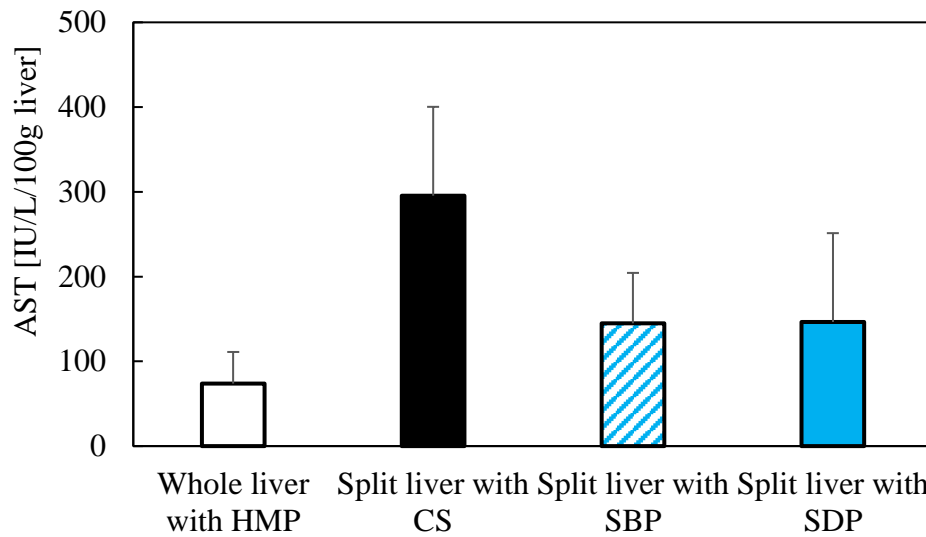


Fig.4.3.28 The release of AST per liver weight during IRM from 0 to 120 min

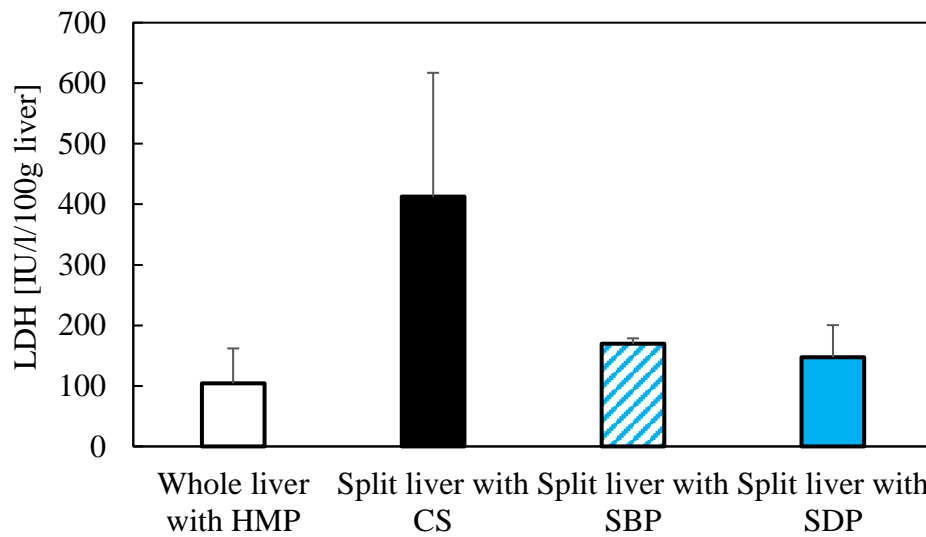


Fig.4.3.29 The release of LDH per liver weight during IRM from 0 to 120 min

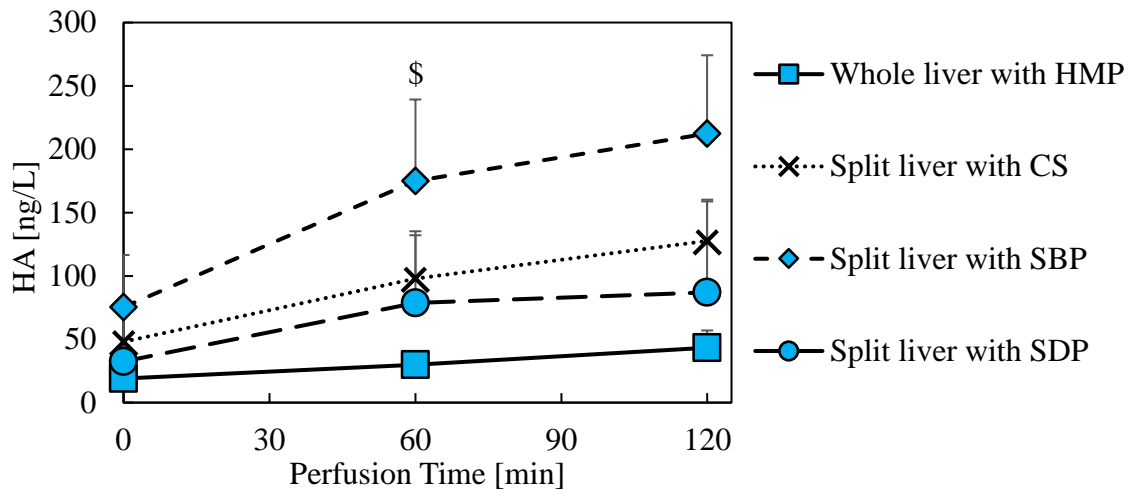


Fig.4.3.30 The amount of HA during IRM after CS or HMP

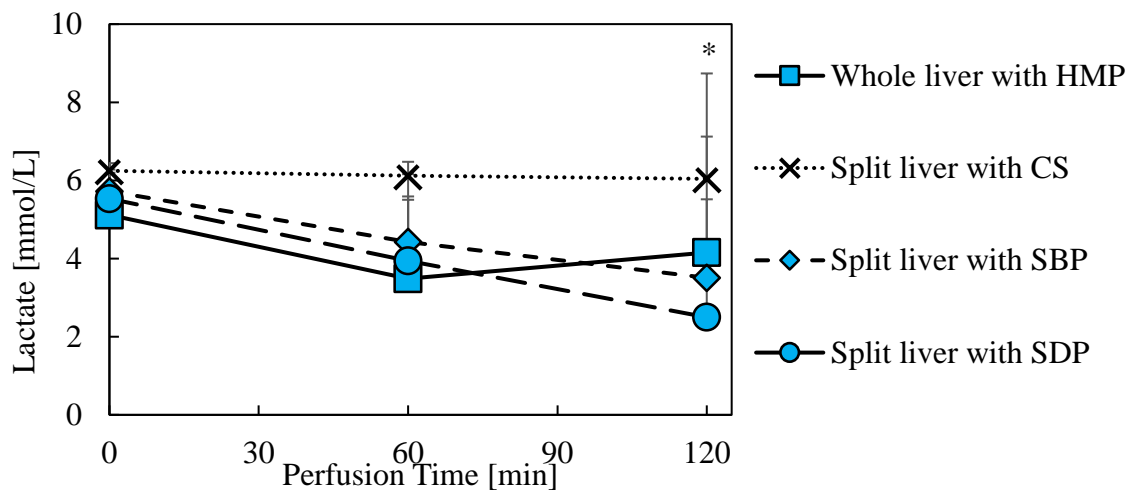


Fig.4.3.31 Lactate level of perfusate during IRM after CS or HMP

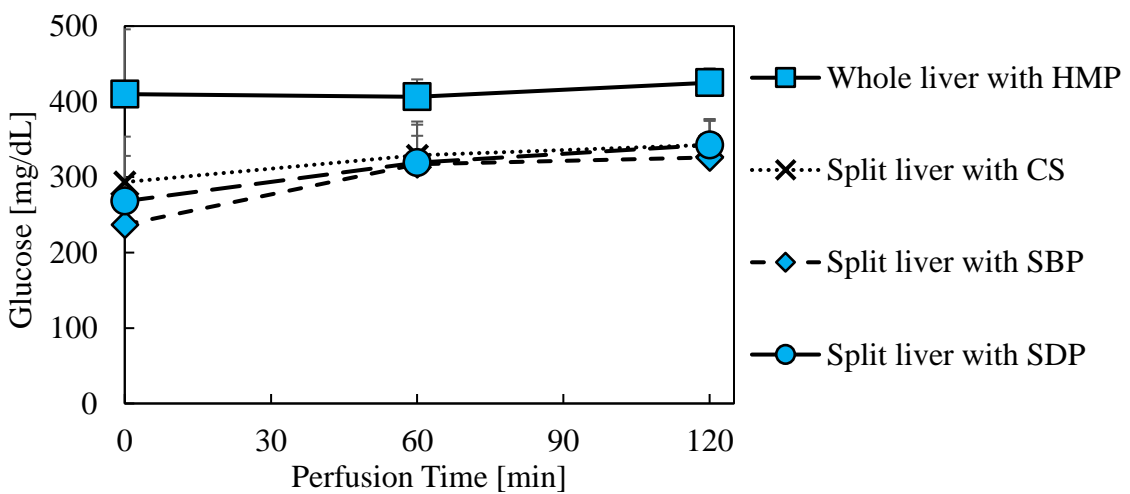


Fig.4.3.32 Glucose level of perfusate during IRM after CS or HMP

4.3.6 体外血液再灌流モデルによる肝臓代謝因子

体外血液再灌流モデル実験における酸素消費量や灌流液中の pH, またそれに伴う肝臓代謝因子を示す. Fig.4.3.33 には再灌流中の酸素消費量, Fig.4.3.34 には灌流液中 pH を示した. 酸素消費量は, 全肝が最低値を示したが, これは 3.5 節の体外血液再灌流モデルの検定結果でも記した通り人工肺の状態や, 全血と比し再灌流液のヘマトクリット値が低値であり, 酸素需要に対して供給量が不足してしまったことによるものである. それを踏まえて, 分割肝の実験群を比較すると, 統計学的に有意な差は示されなかったが, SDP 群において最も高値を示した. また酸素供給量不足に伴い, 全肝では灌流液中 pH がアシドーシスの傾向を示したが, その他分割肝の実験群においては比較的安定した値を示し, 健全な代謝機能を示した.

Fig.4.3.35-38 には, ATP 合成における中間代謝の駆動力であるプロトン指数, および初期値に対するその変化量を示した. これより, 分割肝, 低温機械灌流群である SBP, SDP 群において, 全肝と同程度の値を維持し, 良好な代謝機能を示した. またプロトン指数変化量においても, 再灌流開始から時間とともに上昇傾向にあり, 代謝活性の進行が示された. Fig.4.3.39-42 には臓器全体の代謝機能指標である, 肝臓代謝指数, およびその初期値に対する変化量を示した. これより分割肝である SBP 群, SDP 群において, 全肝と比し統計学的に有意に高値を示し, 健全な機能を持つ全肝と同等以上の代謝機能を示した.

本実験では, 分割肝移植における分割処理に対して, 低温機械灌流法による臓器再生, あるいは阻血時間の短縮や術中の温度管理による障害軽減の可能性を検討した. 流動指標や肝機能, 代謝機能において, 低温機械灌流群は全肝と同程度の機能を示し, その有用性を明らかにした. 特に SDP 群, つまり灌流しながら分割する群では流動指標や血管内皮障害の観点から顕著に良好な結果を示し

た．その理由は定かではないが，阻血時間の短縮や術中の温度管理といった障害を与えないことだけでなく，分割処理中に臓器内に生じた障害性の液性因子を持続的に洗い流すことで，血管内皮へ良好な影響を寄与したと推測され，今後も原因の究明に向け，引き続き議論が必要であるといえる．

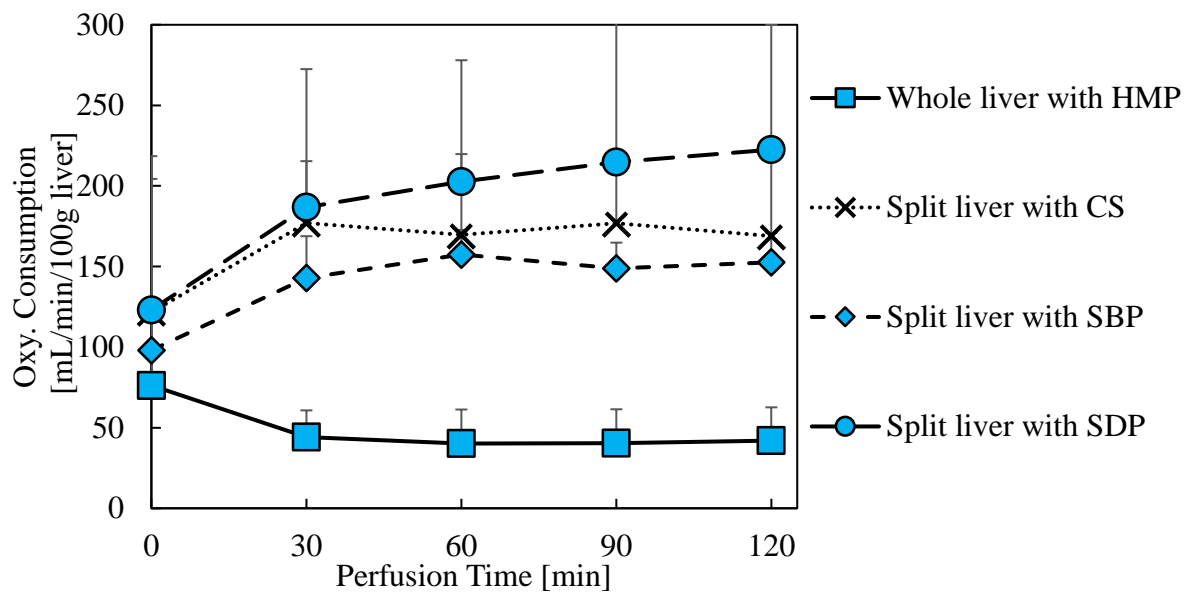


Fig.4.3.33 Oxy. Consumption during IRM after CS or HMP

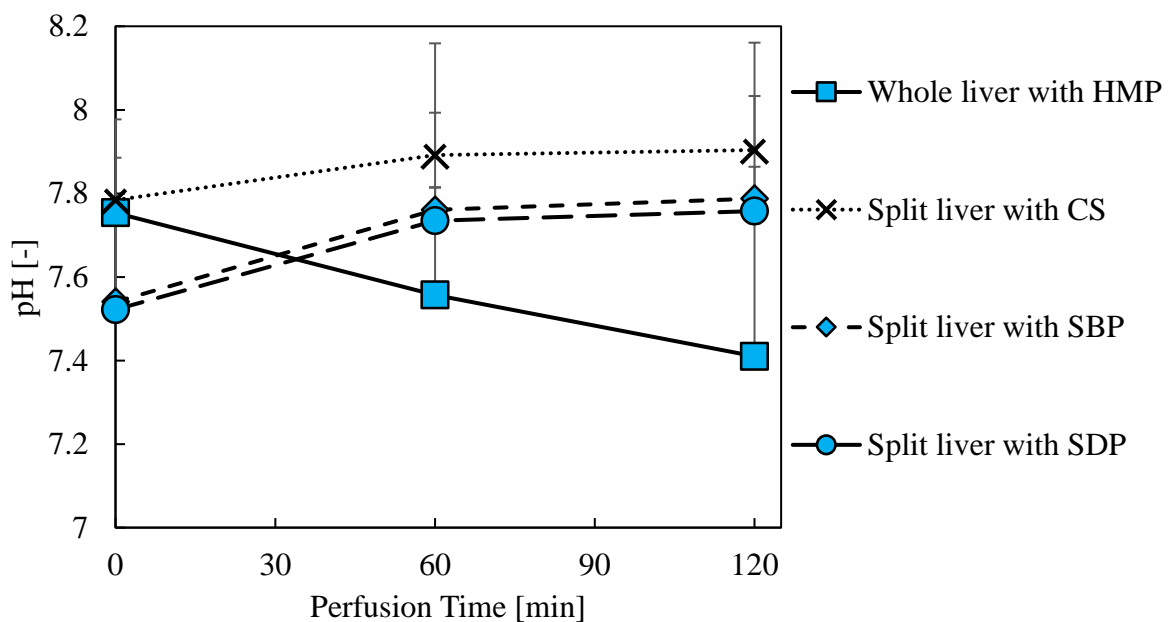


Fig.4.3.34 pH of perfusate during IRM after CS or HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP,
 \$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

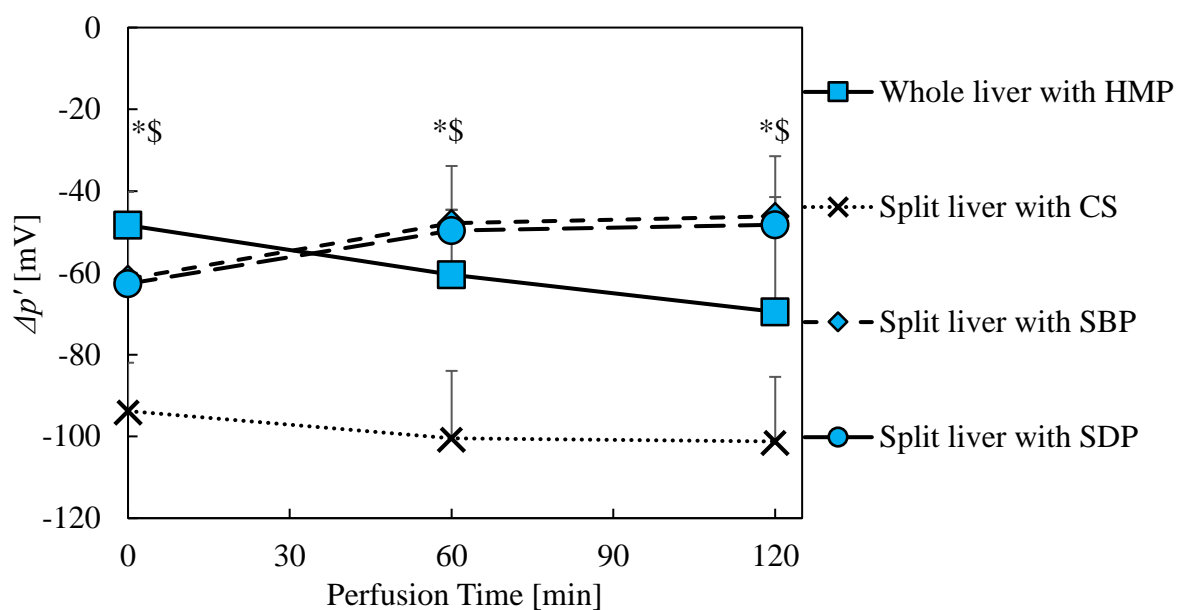


Fig.4.3.35 Proton index during HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP,
 \$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

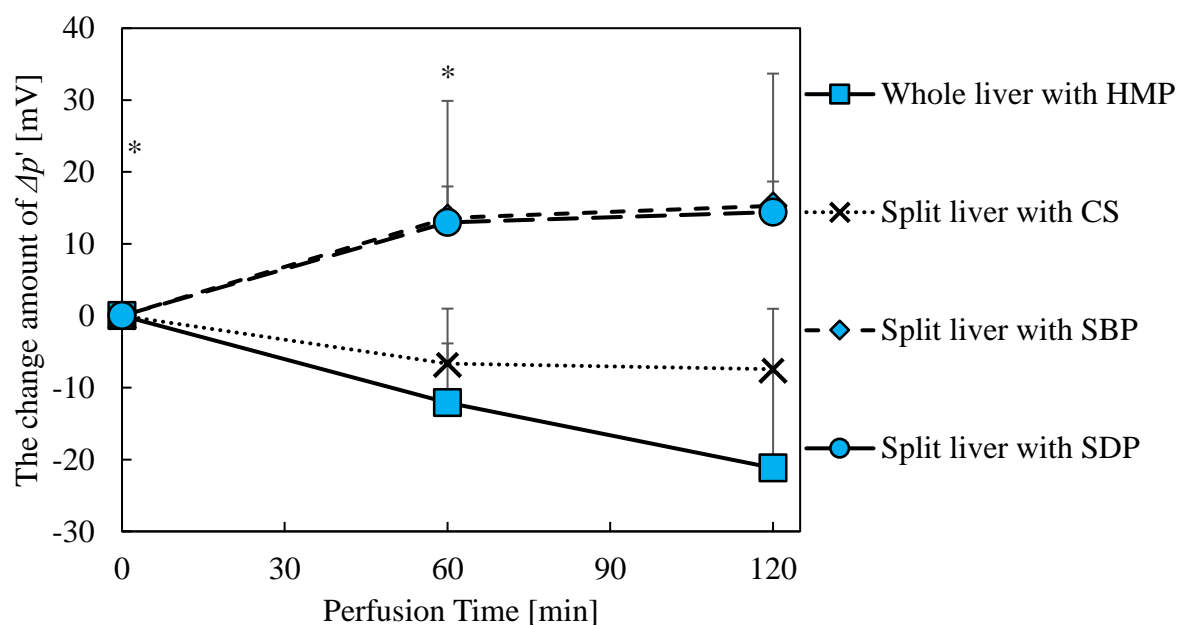


Fig.4.3.36 The change amount of proton index during IRM after CS or HMP

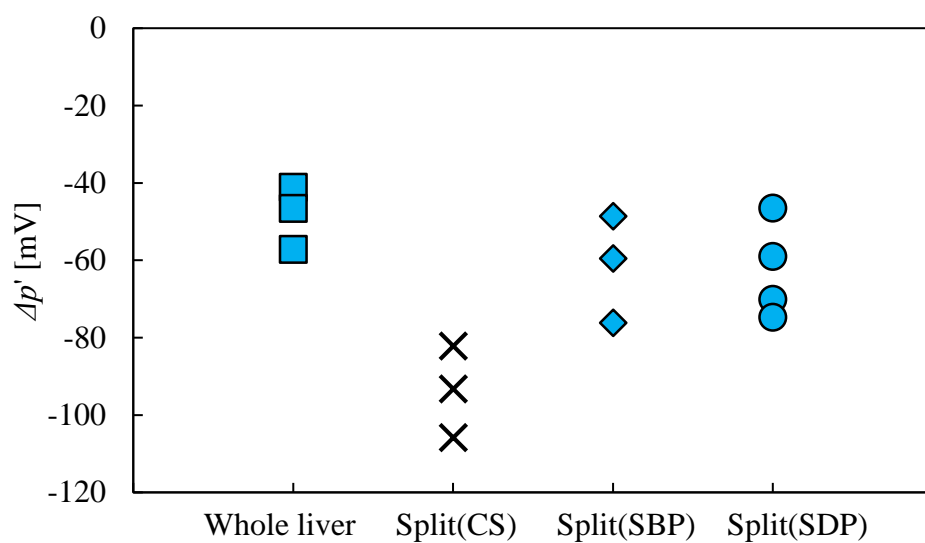


Fig.4.3.37 Proton index during IRM after CS or HMP at 0min

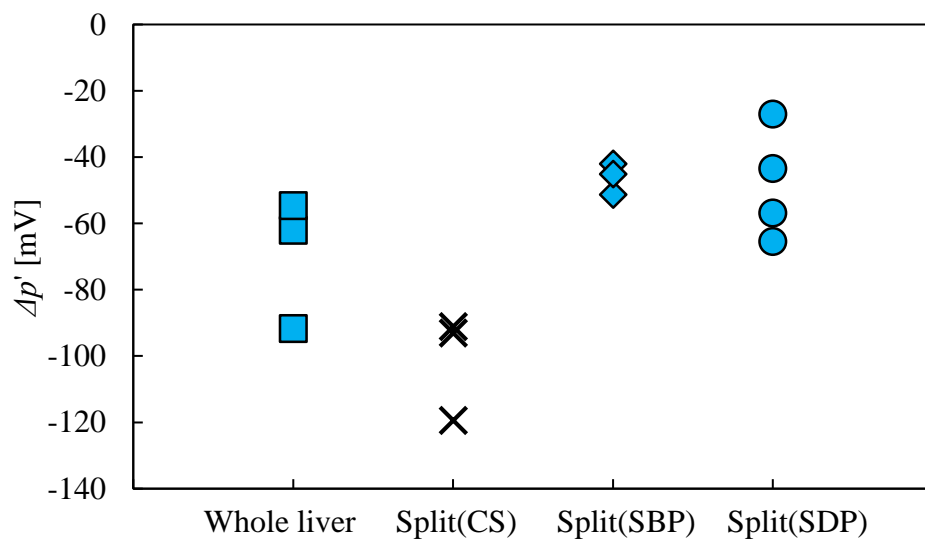


Fig.4.3.38 Proton index during IRM after CS or HMP at 60min

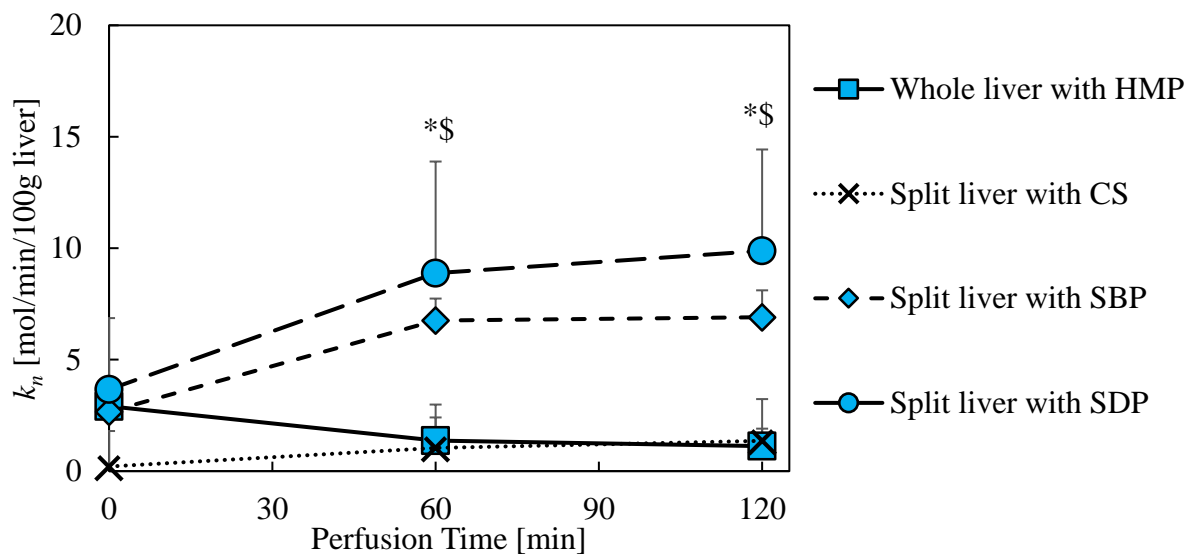


Fig.4.3.39 Metabolic index during IRM after CS or HMP

*Whole liver with HMP vs Split liver with SBP,
 #Split liver with SBP vs Split liver with SDP,
 \$Split liver with CS vs Split liver with SBP; $p < 0.05$

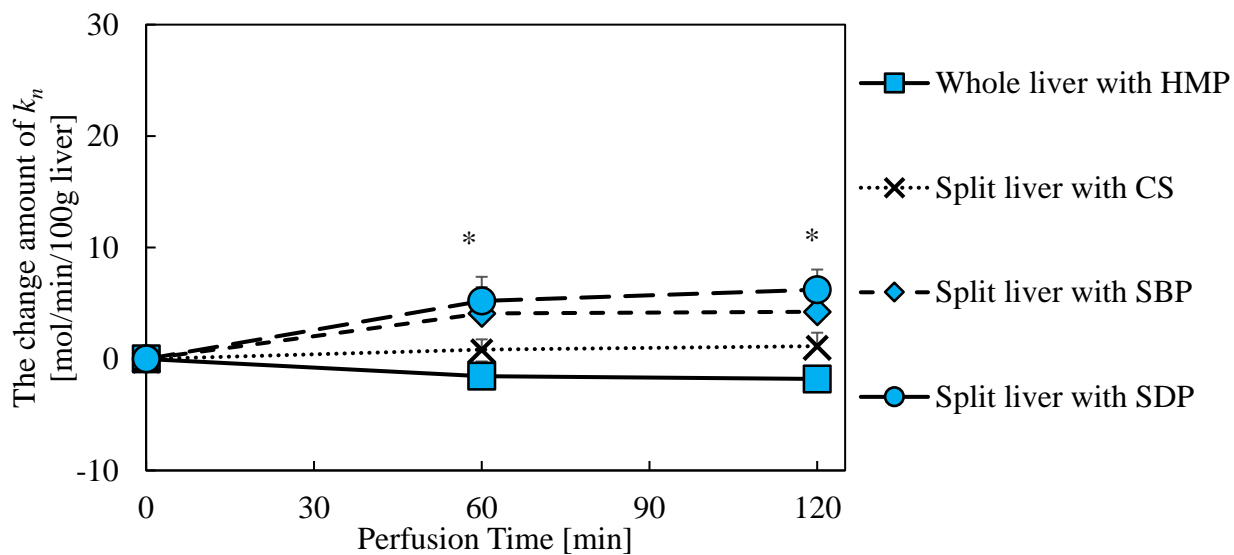


Fig.4.3.40 The change amount of Metabolic index during IRM

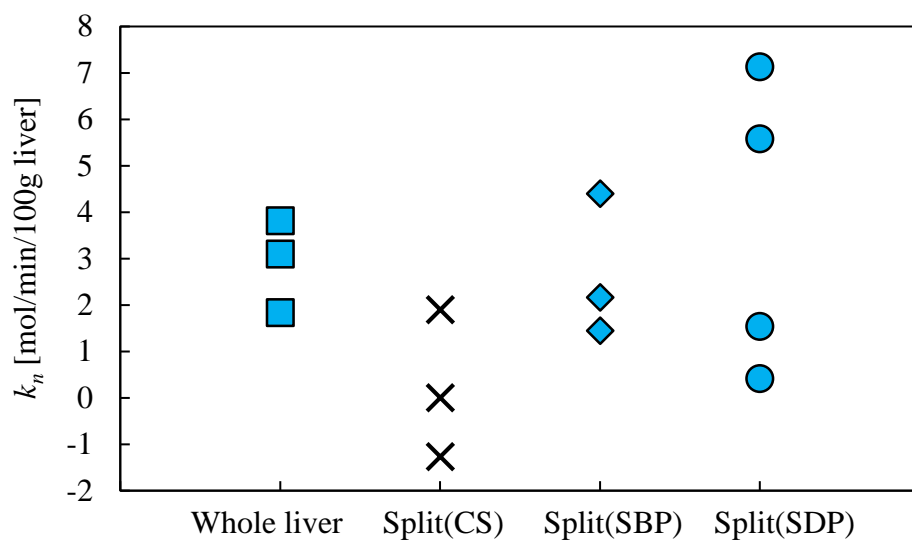


Fig.4.3.41 Metabolic index during IRM in 0min

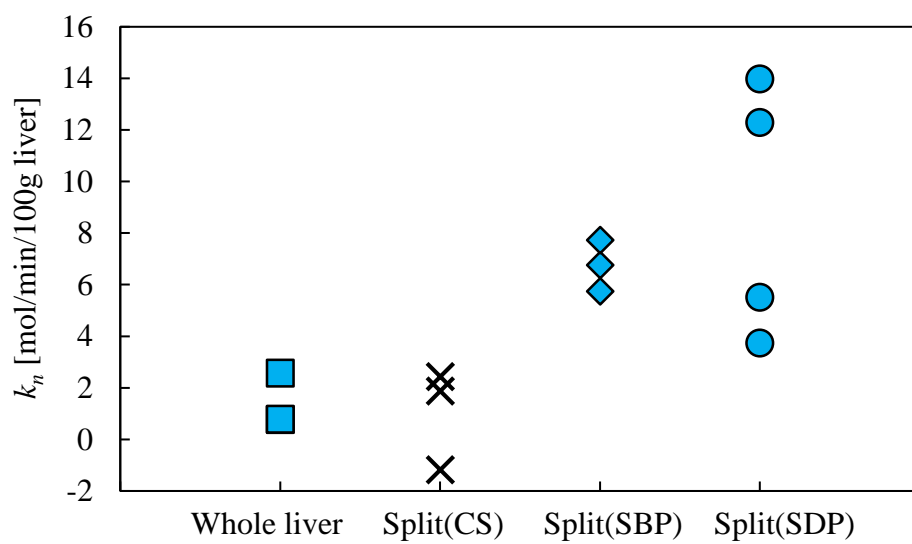


Fig.4.3.42 Metabolic index during IRM in 60min

4.4 総合考察

移植医療において慢性的なドナー不足は世界的な課題であり，一人でも多くの肝疾患患者の救命には移植適合臓器の拡大，および移植前機能評価が必要不可欠である．特に機械灌流法による移植前機能評価法は，生検組織診断や胆汁の生成量，成分分析から灌流の流動評価まで，世界中から多種多様な報告が行われているが，残念ながら現状では移植の可否を決定づけるための評価法は確立されておらず，今後は灌流中に評価が可能な定量的な評価指標が求められている．本研究では，灌流中に経時的に得られる各種代謝因子から算出した肝臓代謝指数を提案し，各種実験に対してその有用性を検討した．特に 4.1 心停止後肝臓への室温機械灌流法の有用性の評価では，肝臓代謝指数を用いて温阻血時間 0，30，60 分の三種類の条件で障害を規定した肝臓の評価を行い，温阻血時間 30 分までの心停止後肝臓に対する室温機械灌流法の有用性を明らかにし，一方で温阻血時間 60 分の肝臓では非常に厳しい臓器機能を示唆した．加えて，灌流中の肝臓代謝指数と再灌流中の肝臓代謝指数，あるいは再灌流中の各種指標と比較を行うことで，灌流中の移植前機能評価指標としての有用性を検討した．結果として肝機能指標である逸脱酵素 AST，LDH などの一部指標とは相関を示さなかった一方で，血管圧やラクテート，グルコース，逸脱酵素 ALP などの肝臓代謝機能にまつわる指標とはそれぞれ有意に相関を示し，移植前機能評価指標としての有用性を明らかにした．またここで得られた結果を受けて，4.2 人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法，および 4.3 分割肝移植への低温機械灌流法の適用においても同様の検討を行った．4.2 では温阻血時間 60 分と極めて厳しい条件下で摘出した肝臓を使用したこともあり，各群間で明らかな差は示されなかったが，人工酸素運搬体含有群において若干の代謝機能の改善を示し，酸素運搬能の有効性を示唆した．4.3 については，灌

流中の酸素消費量が微小で、測定精度の問題もあったことから中間代謝の指標であるプロトン指数による評価を行ったが、分割処理によって障害を有した肝臓においてそれぞれ顕著な代謝機能の回復傾向を示した。これは、保存後の血液再灌流中の代謝指標や各種指標においても明らかであり、分割肝グラフトに対する低温機械灌流法の有用性を肝臓代謝指標によって明らかにした。

前述の通り肝臓の機能や構造は非常に多様な因子が関連して構成されていることから、最適な保存条件の確立や移植前機能評価に向けて不明瞭な点は少なくない。本研究では特に代謝機能に注目して、移植前機能評価法の検討を行ったが、一方でより詳細な評価を行うためには流動機能や肝機能、胆管機能や温度などの環境要因など、多面的な評価指標による総合的な評価が必要である。そのため本研究で取り組んだ ICG 蛍光法を用いた代謝機能評価や、胆管圧計測による胆管機能評価も含めて各種指標の定量化は重要課題であり、移植医療の高度化に向けて、今後も工学的観点からの議論は必要不可欠であるといえる。

五章 結論

本研究では肝臓代謝機能に注目し、マージナルドナー拡大に向けた障害肝の再生、および定量的な評価指標の確立のために検討を行い、以下に示す結論を得た。

- (1) 心停止後肝臓への室温機械灌流法による臓器再生を検討し、その有用性を明らかにした。ただし温阻血時間 60 分を経て摘出された肝臓では、保存後であっても厳しい臓器機能であったことから、現状の技術では温阻血時間が 30 分から 60 分の間に境界線が存在することが予想される。
- (2) 機械灌流法における代謝因子動態、特に灌流液中 pH や酸素消費量に注目した移植前機能評価手法の提案を行い、肝臓代謝指標を提案した。合わせて、肝臓代謝機能と密接に関りがある指標についてその有用性を明らかにしたが、一部指標の予測には課題を有し、今後より多面的な評価が必要になるといえる。
- (3) 人工酸素運搬体含有灌流液による室温機械灌流法の有用性を検討した。若干の代謝機能の改善は示されたが、肝動脈圧の上昇や逸脱酵素流出量の増加など、従来の灌流液と比し課題も多く今後も議論が必要である。
- (4) 分割肝移植における、術中の温度管理と阻血時間の短縮が可能となる低温機械灌流法の適用を検討し、その有用性を明らかにした。特に低温で灌流しながら分割処理を行うことで、血管内皮障害の軽減、および良好な流動機能の維持を示した。

謝辞

本研究の遂行に当たり終始手厚い指導，並びに懇切丁寧な指示を賜りました指導教官 小原 弘道 准教授，ならびに水沼 博 前教授に深く感謝の意を表します。

お忙しい中副査を担当していただき，有益な指導をいただきました小方聡准教授，角田直人准教授に心より感謝いたします。

動物実験遂行における臓器摘出，ならびに実験計画の作成に有益な指導を頂きました 旭川医科大学 松野 直徒医師，技能補助員 佐武由康先生，ならびにご協力していただいた全ての先生方に心より感謝いたします。

研究の背景を学ぶにあたり，貴重な情報を得る機会，および有益な指導をいただきましたNPO法人 Life Bridge Japan 理事長 窪田 基予子 先生に心より感謝いたします。

灌流保存液開発にあたり東京薬科大学 教授 平野俊彦先生に心より感謝いたします。

本研究の遂行に当たり，器具や施設を使用させていただき，ご協力，ご助力いただきました、国立成育医療センター 絵野沢 伸 先生に深く感謝いたします。

最後になりますが常に切磋琢磨しながら，精神的にも支えてくれた，研究室の同期である伊庭洋貴さん，森川朋樹さん，シュイシュンさん，共に研究を進めながら刺激的な議論を行ってきた長谷川海地さん，多くの激励をいただいた流体工学研究室の先輩方，後輩達には公私ともに大変お世話になり，充実した研究室生活を送ることができ，心より感謝いたします。

参考文献

1. 坂井建雄 河原克雅：人体の正常構造と機能，日本医事新報社，pp.264-295 (2012)
2. Anne M. Gilroy: Essential 解剖学—テキスト&アトラス，南江堂, (2015)
3. 公益社団法人 日本臓器移植ネットワーク（社）：日本臓器移植ネットワーク 臓器移植に関する提供件数と移植件数, (2018)
<https://www.jotnw.or.jp/datafile/offer/2018.html>
4. Organ Procurement and Transplantation Network: National date, (2018)
<https://optn.transplant.hrsa.gov>
5. 日本肝移植研究会．肝移植症例登録報告．移植． Vol. 52, pp134-147 (2016)
6. International registry in organ donation and transplantation, world wide actual deceased organ donors 2017 (2018), www.irodat.org
7. 浅野武秀，福嶋教偉，剣持敬，松野直徒：マージナルドナー，丸善出版株式会社， pp.7-9 (2011)
8. Pichlmayr R, Ringe B, Gubernatis G, Hauss J, Bunzendahl H: Transplantation of a donor liver to 2 recipients (splitting transplantation) - a new method in the further development of segmental liver transplantation, *Langenbecks Arch Chir*, Vol.373(2) pp127-130 (1988)
9. 内田 孟，重田 孝信，日比 泰造 他．脳死肝移植ワーキンググループミーティング報告．移植, Vol. 51(6), pp464-469 (2016)
10. Renz JF, Emond JC, Yersiz H, Ascher NL, Busuttil RW. Split-liver transplantation in the United States: outcomes of a national survey, *Ann Surg*, Vol. 239(2), pp172-181 (2004)
11. 吉川遼，松野直徒，高橋裕之 他，分割肝グラフトへの機械灌流法適用の検討，*Organ biology*, Vol. 25 (2), pp197-201 (2018)

12. 松野直徒, 小原弘道, 水沼博, 武藤眞, 平野俊彦, 絵野沢伸: 臨床における臓器保存方法の最近の進歩—持続灌流保存, *Organ Biology*, Vol.17(3), 2010, pp245-255
13. 松野直徒, 小原弘道, 平野俊彦: 臓器保存から臓器再生へ 心停止ドナーからの肝移植と持続灌流保存, *Organ Biology*, Vol.20(2), 2013, pp165-168
14. 小原弘道, 松野直徒, 吉川遼 他, 臓器機械灌流による臓器機能評価技術の新展開, *Organ Biology*, Vol.25(2), pp192-196 (2018)
15. Cornelia J Verhoeven, Waqar R.R. Farid, Jeroen de Jouge, et al. Biomarkers to assess graft quality during conventional and machine preservation in liver transplantation, *J Hepatol*, Vol.61(3), pp672-684 (2014)
16. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, et al. Hypothermic machine preservation facilitates successful transplantation of extended criteria donor livers. *Am J Transpl*, Vol. 15, pp161-169 (2015)
17. Organ Recovery Systems, LifePort Liver transporter (2018); <https://www.organ-recovery.com/lifeport-liver-transporter>
18. Nasralla D, Coussios CC, Merqental H, et al. A randomized trial of normothermic preservation in liver transplantation. *Nature*; Vol. 557, pp50-56 (2018)
19. Organ Ox living organs for life, Transportable Ex Vivo Normothermic Preservation(2018); <http://www.organox.com/>
20. Bruinsma BG, Yeh H, Ozer S, et al. Subnormothermic Machine Perfusion for ex vivo Preservation and Recovery of the Human Liver for Transplantation. *Am J Transplant*, Vol. 14, pp1400-1409 (2015)
21. Organ Assist, Products, Liver Assist(2018); <https://www.organ-assist.nl/products/liver-assist>

22. Moers C, Smits JM, Maathuis MH, et al. Machine perfusion or cold storage in deceased-donor kidney transplantation. *N Engl J Med* ,Vol. 360, pp7–19 (2009)
23. Schlegel A, Dutkowi P, Impact of Machine Perfusion on Biliary Complications after Liver Transplantation, *Molecular Sciences*, Vol.19(11), pp1-15(2018)
24. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant*, Vol.10, pp372–381 (2010)
25. Dutkowski P, Schlegel A, de OliveiraM, Mullhaupt B, Neff F, Clavien PA. HOPE for human liver grafts obtained from donors after cardiac death, *J Hepatol*, Vol.60, pp765–772(2014)
26. Schlegel A, Muller X, Kalisvaart X, et al. Outcomes of DCD liver transplantation using organs treated by hypothermic oxygenated perfusion before implantation, *J Hepatol*, (2018), in press.
27. Henry SD, Guarrera JV. Protective effects of hypothermic ex vivo perfusion on ischemia/ reperfusion injury and transplant outcomes, *Transplant Rev (Orlando)* ,Vol.26, pp163–175(2012)
28. Guarrera JV. Assist devices: machine preservation of extended criteria donors. *Liver Transpl* Vol.18, S31–3(2012)
29. Henry SD, Nachber E, Tulipan J, et al. Hypothermic machine preservation reduces molecular markers of ischemia/reperfusion injury in human liver transplantation, *Am J Transplant*, Vol.12, pp2477–2486(2012)
30. Morito N, Obara H, Matsuno N, et al. Oxygen consumption during hypothermic and subnormothermic machine perfusions of porcine liver grafts after cardiac death, *J artificial organ*, (2018), in press.

31. Vairetti M, Ferrigno A, Carlucci F, et al. Subnormothermic machine perfusion protects steatotic livers against preservation injury: a potential for donor pool increase? *Liver Transpl*, Vol.15, pp20–29(2009)
32. Knaak JM, Spetzler VN, Goldaracena N, et al. Subnormothermic ex vivo liver perfusion reduces endothelial cell and bile duct injury after donation after cardiac death pig liver transplantation, *Liver Transpl*, Vol.20, pp1296–13(2014)
33. Okamura Y, Hata K, Tanaka H, et al. Impact of Subnormothermic Machine Perfusion Preservation in Severely Steatotic Rat Livers: A Detailed Assessment in an Isolated Setting, *Am J Transplant*, Vol.17, pp1204-1215(2017)
34. Spetzler VN, Goldaracena N, Echiverri J, et al. Subnormothermic Ex Vivo Liver Perfusion is a Safe Alternative to Cold Static Storage for Preserving Standard Criteria Grafts, *Liver Transpl*, Vol.22, pp111-119(2016)
35. Westerkamp AC, Mahboub P, Meyer SL, et al. End-ischemic machine perfusion reduces bile duct injury in donation after circulatory death rat donor livers independent of the machine perfusion temperature, *Liver Transpl*, Vol.21, pp1300-1311(2015)
36. Shonaka T, Matsuno N, Obara H, et al. Application of Perfusate With Human-Derived Oxygen Carrier Solution Under Subnormothermic Machine Perfusion for Donation After Cardiac Death Liver Grafts in Pigs, *Transplant proc*, Vol.50(9), pp2821-2825 (2018)
37. Fontes P, Lopez R, van der Plaats A, et al. Liver Preservation With Machine Perfusion and a Newly Developed Cell-Free Oxygen Carrier Solution Under Subnormothermic Conditions, *Am J Transplant*, Vol.15, pp381-394 (2015)
38. Liu. Q, Nassar A, Farias K, et al. Comparing Normothermic Machine Perfusion

- Preservation With Different Perfusates on Porcine Livers From Donors After Circulatory Death, *Am J Transplant*, Vol.16(3), pp794-807 (2015)
39. Boehnert MU, Yeung JC, Bazerbachi F, et al. Normothermic acellular ex vivo liver perfusion reduces liver and bile duct injury of pig livers retrieved after cardiac death, *Am J Transplant*, Vol.13, pp1441-1449(2013)
 40. Banan B, Xiao Z, Watson R, et al. Novel strategy to decrease reperfusion injuries and improve function of cold-preserved livers using normothermic ex vivo liver perfusion machine, *Liver transplant*, Vol.22, pp333-343(2016)
 41. Mergental H, Stephen B.T.F, Laing R.W., Development of Clinical Criteria for Functional Assessment to Predict Primary Nonfunction of High-Risk Livers Using Normothermic Machine Perfusion, *Liver Transplant*, Vol.24(10), pp1453-1469(2018)
 42. Nassar A, Liu Q, Farias K, et al. Ex vivo normothermic machine perfusion is safe, simple, and reliable: Results from a large animal model, *Surg Innovation*, Vol.22(1), pp61-69(2015)
 43. Op den Dries S, Karimian N, Sutton ME, et al. Ex vivo normothermic machine perfusion and viability testing of discarded human donor livers. *Am J Transplant* ,Vol.13, pp1327–1335(2013)
 44. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, et al. Liver transplantation after ex vivo normothermic machine preservation: a Phase 1 (first-in-man) clinical trial. *Am J Transplant*, Vol.16, pp1779-1787(2016)
 45. Perera T, Mergental H, Stephenson B, et al. First human liver transplantation using a marginal allograft resuscitated by normothermicmachine perfusion. *Liver Transpl* , Vol.22, pp120–124(2016)

46. Abudhaise H, Davidson B.R., Demuylder P et al. Evolution of dynamic, biochemical, and morphological parameters in hypothermic machine perfusion of human livers: A proof-of-concept study, PLoS ONE, Vol.13(9), (2018)
47. Mergental H, Perera M.T.P.R, Lang R.W. et al. Transplantation of Declined Liver Allografts Following Normothermic Ex-situ Evaluation. Am J Transplant, Vol.16, pp3235-3245(2016)
48. St Peter SD, Imber CJ, Lopez I et al. Extended preservation of non-heart-beating donor livers with normothermic machine perfusion, Br J Surg, Vol.89, pp609-616(2002)
49. Jain S, Lee CY, Baicu S, et al. Hepatic function in hypothermically stored porcine livers: comparison of hypothermic machine perfusion vs cold storage. Transplant Proc, Vol.37, pp340-341(2005)
50. Xu H, Berendsen T, Kim K, Soto-Gutierrez A, et al. Excorporeal normothermic machine perfusion resuscitates pig DCD livers with extended warm ischemia, J Surg Res, Vol.173, pp83-88(2012)
51. Schlegel A, Graf R, Clavien PA, et al. Hypothermic oxygenated perfusion (HOPE) protects from biliary injury in a rodent model of DCD liver transplantation, J Hepatol, Vol.59(5):pp984(2013).
52. Minor T, Efferz P, Fox M, et al. Controlled oxygenated rewarming of cold stored liver grafts by thermally graduated machine perfusion prior to reperfusion. Am J Transplant, Vol.13, pp1450-1460(2013)
53. Liu Q, Nassar A, Farias K, et al. Comparing Normothermic Machine Perfusion Preservation With Different Perfusates on Porcine Livers From Donors After Circulatory Death. Am J Transplant, Vol.16, pp794-807(2016)

54. Hoyer DP, Paul A, Luer S, et al. End ischemic reconditioning of liver allografts: controlling the rewarming. *Liver Transpl*, Vol.22, pp1223-1230(2016)
55. Maione F, Gilbo N, Lazzaro S, et al. Porcine Isolated Liver Perfusion for the Study of Ischemia Reperfusion Injury: A Systematic Review. *Transplantation*, Vol.102(7), pp1039-1049 (2018)
56. Mitchel P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences, *Science*, Vol. 206, pp1148-1159 (1979)
57. 草野光夫, ICG 蛍光 Navigation Surgery のすべて, インターメディカ, pp16-30(2008)
58. Van Leeuwen OB, De Meijer VE, Porte RJ, et al. Viability Criteria for Functional Assessment of Donor Livers During Normothermic Machine Perfusion. *Liver Transpl*, Vol.24(10), pp1333-1335(2018)
59. Mergental H, Stephenson BTF, laing RW, et al. Development of Clinical Criteria for Functional Assessment to Predict Primary Nonfunction of High-Risk Livers Using Normothermic Machine Perfusion. *Liver Transpl*, Vo.24(10), pp1453-1469(2018)
60. Obara H, Matsuno N, Shigeta T, et al. Rewarming Machine Perfusion System for Liver Transplantation, *Journal of Medical Devices*, Vol.7, pp1-7(2013)
61. Araki J, Sakai H, Takeuchi D, et al. Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles, *Transplantation*, Vol.99, pp687-692(2015)
62. Fujihara M, Takahashi D, Abe H, Sakai H, et al. Primary and secondary immune responses to keyhole limpet hemocyanin in rats after infusion of hemoglobin vesicle, an artificial oxygen carrier. *Artificial Organs*, Vol.38, pp234-238 (2014)
63. Schlegel A, Rougemont O, Graf R, et al. Protective mechanisms of end-ischemic cold

machine perfusion in DCD liver grafts. J Hepatol 2013;58(2): 278-286

64. Yoshiakwa R, Matsuno N, Morito N, et al. Evaluation Using an Isolated Reperfusion Model for Porcine Liver Donated After Cardiac Death Preserved with Oxygenated Hypothermic Machine Perfusion. Ann Transplant, Vol.23, pp822-827 (2018)